

HORMONELLE ABHÄNGIGKEIT DER AKTIVITÄT DER
Na-K-ATPase IN GEZÜCHTETEN EPITHELZELLEN DES
SAMMELROHRES DER NIERE

MICHAEL SCHMOLKE

1986

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. med. K. Thureau

Prof. Dr. med. E. Gerlach

Prof. Dr. med. G. ten Bruggencate

Hormonelle Abhängigkeit der Aktivität der Na-K-ATPase in
gezüchteten Epithelzellen des Sammelrohres der Niere

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Schmolke

aus

München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Horster
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. K. Thureau
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 3.6.1986

Inhaltsverzeichnis

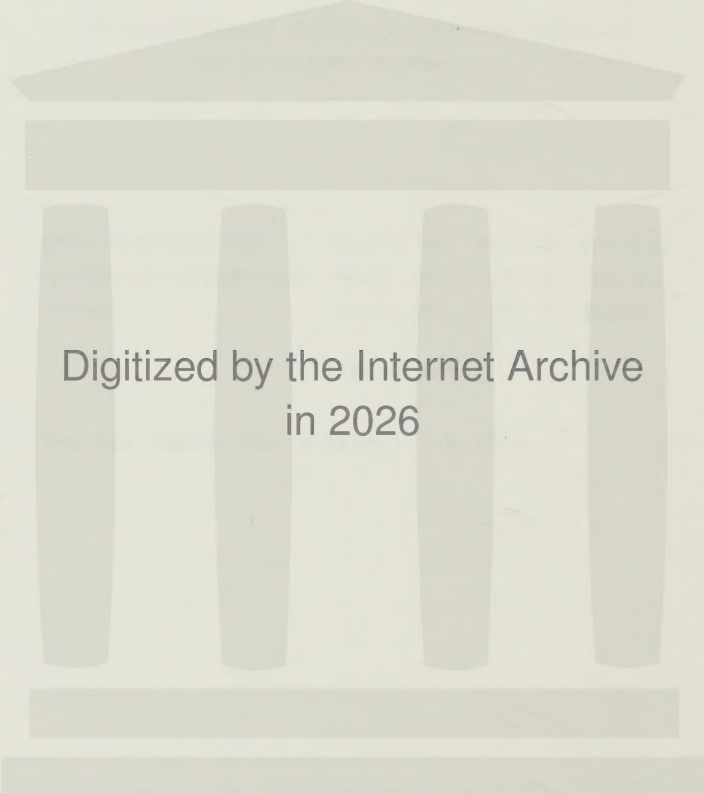
1. Teil

1.1	Einleitung	1
1.2	Die Aufgabenstellung	2
1.3	Die Aufgabenstellung	3
1.4	Die Aufgabenstellung	4
1.5	Die Aufgabenstellung	5
1.6	Die Aufgabenstellung	6

2. Teil

2.1	Die Aufgabenstellung	7
2.2	Die Aufgabenstellung	8
2.3	Die Aufgabenstellung	9
2.4	Die Aufgabenstellung	10
2.5	Die Aufgabenstellung	11
2.6	Die Aufgabenstellung	12
2.7	Die Aufgabenstellung	13
2.8	Die Aufgabenstellung	14
2.9	Die Aufgabenstellung	15
2.10	Die Aufgabenstellung	16
2.11	Die Aufgabenstellung	17
2.12	Die Aufgabenstellung	18
2.13	Die Aufgabenstellung	19
2.14	Die Aufgabenstellung	20
2.15	Die Aufgabenstellung	21
2.16	Die Aufgabenstellung	22
2.17	Die Aufgabenstellung	23
2.18	Die Aufgabenstellung	24
2.19	Die Aufgabenstellung	25
2.20	Die Aufgabenstellung	26
2.21	Die Aufgabenstellung	27
2.22	Die Aufgabenstellung	28
2.23	Die Aufgabenstellung	29
2.24	Die Aufgabenstellung	30
2.25	Die Aufgabenstellung	31
2.26	Die Aufgabenstellung	32
2.27	Die Aufgabenstellung	33
2.28	Die Aufgabenstellung	34
2.29	Die Aufgabenstellung	35
2.30	Die Aufgabenstellung	36
2.31	Die Aufgabenstellung	37
2.32	Die Aufgabenstellung	38
2.33	Die Aufgabenstellung	39
2.34	Die Aufgabenstellung	40
2.35	Die Aufgabenstellung	41
2.36	Die Aufgabenstellung	42
2.37	Die Aufgabenstellung	43
2.38	Die Aufgabenstellung	44
2.39	Die Aufgabenstellung	45
2.40	Die Aufgabenstellung	46
2.41	Die Aufgabenstellung	47
2.42	Die Aufgabenstellung	48
2.43	Die Aufgabenstellung	49
2.44	Die Aufgabenstellung	50
2.45	Die Aufgabenstellung	51
2.46	Die Aufgabenstellung	52
2.47	Die Aufgabenstellung	53
2.48	Die Aufgabenstellung	54
2.49	Die Aufgabenstellung	55
2.50	Die Aufgabenstellung	56
2.51	Die Aufgabenstellung	57
2.52	Die Aufgabenstellung	58
2.53	Die Aufgabenstellung	59
2.54	Die Aufgabenstellung	60
2.55	Die Aufgabenstellung	61
2.56	Die Aufgabenstellung	62
2.57	Die Aufgabenstellung	63
2.58	Die Aufgabenstellung	64
2.59	Die Aufgabenstellung	65
2.60	Die Aufgabenstellung	66
2.61	Die Aufgabenstellung	67
2.62	Die Aufgabenstellung	68
2.63	Die Aufgabenstellung	69
2.64	Die Aufgabenstellung	70
2.65	Die Aufgabenstellung	71
2.66	Die Aufgabenstellung	72
2.67	Die Aufgabenstellung	73
2.68	Die Aufgabenstellung	74
2.69	Die Aufgabenstellung	75
2.70	Die Aufgabenstellung	76
2.71	Die Aufgabenstellung	77
2.72	Die Aufgabenstellung	78
2.73	Die Aufgabenstellung	79
2.74	Die Aufgabenstellung	80
2.75	Die Aufgabenstellung	81
2.76	Die Aufgabenstellung	82
2.77	Die Aufgabenstellung	83
2.78	Die Aufgabenstellung	84
2.79	Die Aufgabenstellung	85
2.80	Die Aufgabenstellung	86
2.81	Die Aufgabenstellung	87
2.82	Die Aufgabenstellung	88
2.83	Die Aufgabenstellung	89
2.84	Die Aufgabenstellung	90
2.85	Die Aufgabenstellung	91
2.86	Die Aufgabenstellung	92
2.87	Die Aufgabenstellung	93
2.88	Die Aufgabenstellung	94
2.89	Die Aufgabenstellung	95
2.90	Die Aufgabenstellung	96
2.91	Die Aufgabenstellung	97
2.92	Die Aufgabenstellung	98
2.93	Die Aufgabenstellung	99
2.94	Die Aufgabenstellung	100
2.95	Die Aufgabenstellung	101
2.96	Die Aufgabenstellung	102
2.97	Die Aufgabenstellung	103
2.98	Die Aufgabenstellung	104
2.99	Die Aufgabenstellung	105
2.100	Die Aufgabenstellung	106

Für Brigitte



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	
1.1 Biochemische Eigenschaften der Na-K-ATPase	1
1.2 Physiologische Funktion der Na-K-ATPase	6
1.3 Verteilung, Funktion und Regulation der Na-K-ATPase im Nephron	9
1.4 Na-K-ATPase in gezüchteten Epithelien	21
1.5 Fragestellung der Arbeit	22
2. <u>Methodik</u>	
2.1 Entnahme des Nierengewebes	23
2.2 Medien und Lösungen	23
2.3 Probenvorbereitung der Nephronsegmente	27
2.3.1 Dissektion der Sammelrohre	27
2.3.2 Messung der Tubuluslänge	27
2.4 Probenvorbereitung der Zellkulturen	27
2.4.1 Dissektion der Sammelrohre	27
2.4.2 Primärkulturen von Zellen des kortikalen Sammelrohres	28
2.4.3 Bestimmung der Zellzahl	30
2.4.4 Hormonelle Zusammensetzung des Nährmediums	30
2.5 Messung der Na-K-ATPase Aktivität	33
2.5.1 Übertragen des Segmentes in das Reaktionsgefäß	33
2.5.2 Übertragen der gezüchteten Zellen in das Reaktionsgefäß	34
2.5.3 Hypotischer und thermischer Schock	34
2.5.4 Inkubation, Reaktionsstop und Probennachbearbeitung	36

	Seite
2.5.5 Standards	38
2.5.6 Szintillationsmessung	38
2.5.7 Berechnungen	38
2.6 Vorversuche	39
2.6.1 Einfluß der Probennachbearbeitung auf die Szintillationsmessung	39
2.6.2 Zeitabhängigkeit des Leerwertes	40
3. <u>Ergebnisse</u>	
3.1 Vorversuche	41
3.1.1 Einfluß der Probennachbereitung auf die Szintillationsmessung	41
3.1.2 Zeitabhängigkeit des Leerwertes	41
3.2 In vitro Züchtung von Sammelrohrepithelien	44
3.3 Morphologische Veränderungen der Zellen während der Schockphase	45
3.4 Aktivität der Na-K-ATPase in Sammelrohrsegmenten	45
3.5 Die Aktivität der Na-K-ATPase in gezüchteten Epithelien des Sammelrohres	50
3.5.1 Abhängigkeit der Aktivität der Na-K-ATPase von der Zellzahl	50
3.5.2 Die Aktivität der Na-K-ATPase in gezüchteten Sammelrohrzellen bei unveränderter Zusammensetzung des Nährmediums	
3.5.3 Einfluß der Änderung des Nährmediums auf die Aktivität der Na-K-ATPase	53
3.5.4 Änderung der Aktivität der Na-K-ATPase während der Inkubation der gezüchteten Zellen im Nährmedium ohne Hormonzusatz	56
3.5.5 Einfluß einer dreistündigen Hormonzugabe nach mehr als zweitägiger Hormonverarmung des Nährmediums	60

	Seite
4. <u>Diskussion</u>	
4.1 Zur Methodik	61
4.1.1 Messung der Radioaktivität	61
4.1.2 Leerwerte	63
4.1.3 Thermoosmotischer Schock	64
4.1.4 Vergleich der Aktivität der Na-K-ATPase (γ - ^{32}P -Nachweis) mit anderen Meßmethoden	64
4.2 Bedeutung der Größe der Zellmonolayer für die Enzymmessung	67
4.3 Hormonelle Beeinflussung der Aktivität der Na-K-ATPase in gezüchteten Sammel- rohrzellen	68
4.3.1 Chronische Hormonzufuhr bzw. Hormonentzug	68
4.3.2 Akute Hormonwirkungen der NNR-Steroide nach chemischer "in vitro Adrenalektomie"	72
5. <u>Zusammenfassung</u>	74
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	76

1. Einleitung

In allen Organismen ist das Ionenmilieu des Intrazellulär-raumes und des Interstitiums unterschiedlich zusammengesetzt. Im Zellinneren herrschen eine hohe Kaliumkonzentration (150 mM) und eine niedrige Natriumkonzentration (12 mM) vor, im Gegensatz dazu betragen die Kaliumkonzentration des Interstitiums 5 mM und dessen Natriumkonzentration 145 mM. Die durch diese hohen Konzentrationsunterschiede beider Ionen bedingten chemischen Gradienten bewirken einen passiven Einstrom von Natrium in die Zelle und einen passiven Ausstrom von Kalium aus der Zelle.

Die Aufrechterhaltung dieser Gradienten und damit der Funktionsfähigkeit der Zelle benötigt einen aktiven Ionentransport über die Zellmembran. Für die Durchführung dieser Transporte ist ein ATP-spaltendes Membranprotein identifiziert worden, das gleichzeitig Natrium zellauswärts und Kalium zelleinwärts transportiert.

Man bezeichnet das Protein als Natrium- und Kalium-aktivierte Adenosintriphosphatase, Na-K-ATPase.

1.1 Biochemische Eigenschaften der Na-K-ATPase

Die Struktur der Na-K-ATPase ist in der Niere (34, 45, 47), der rektalen Salzdrüse des Haifisches (37), dem elektrischen Organ des Zitteraales (8, 17) und dem Rattengehirn (26) untersucht worden.

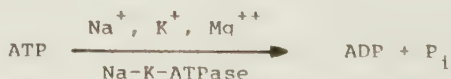
Das Enzym ist ein in der Zellmembran eingelagertes Protein, das aus zwei Untereinheiten, α - und β -Einheit, besteht. Die 100000 u schwere α -Einheit (52, 54, 55) mit ihrem hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren (46) durchsetzt die gesamte Zellmembran, wobei der intrazelluläre Anteil eine viermal größere Oberfläche als der extrazelluläre hat (47, 83; Abb. 1).

Die β -Einheit ist ein 52000 u schweres Glykoprotein (17,

36) mit einem Kohlehydratanteil von 17000 u und befindet sich ausschließlich auf der extrazellulären Seite (83). Zwei α -Einheiten (α_2 -Dimer) bilden unter physiologischen Bedingungen das Grundgerüst eines Na-K-ATPase Moleküles (47), wobei je nach Spezies an einer α -Einheit eine oder zwei β -Einheiten angelagert sein können. Das gesamte Molekül ist dann wie in der Kaninchenniere ein $\alpha_2\beta_2$ -Oligomer (34, 45) mit 315000 u oder wie in der Salzdrüse des Haifisches ein $\alpha_2\beta_4$ -Oligomer mit 415000 u (37).

Die Na-K-ATPase vollzieht gleichzeitig den Transport von Natrium und Kalium, bei in vitro Versuchen auch dessen Analoge $Rb^+ > Tl^+ > NH_4^+ > Cs^+$ in abnehmender Affinität zum Enzym (12), entgegen ihren Konzentrationsgradienten über die Zellmembran. Die für diesen aktiven, aufwärts gerichteten Transport benötigte Energie liefert ATP.

Pro Transportzyklus wird ein Na-K-ATPase Molekül unter Abspaltung des terminalen Orthophosphates vom ATP (74) an einen Aspartylrest phosphoryliert (12) und transportiert damit drei Natriumionen aus der Zelle heraus und zwei Kaliumionen in die Zelle hinein (6, 31, 74). Diese Reaktion läuft jedoch nur in Gegenwart von Magnesiumionen ab, da ein Magnesium-ATP-Komplex und nicht das ATP an sich das Substrat für das Enzym darstellt (38, 49). Daraus ergibt sich folgende Reaktionsgleichung:



Zusätzliche Bedingung für eine ungestörte Enzymfunktion ist die Einbettung des Moleküls in eine Phospholipidmembran. Auch bei Messungen von hochgereinigter Na-K-ATPase muß sich noch jedes Molekül in einem kleinen Membranfragment befinden (Mikro-Umgebung), denn ein vollständiges Herauslösen des Enzymes aus der es umgebenden Lipidschicht führt zu einem kompletten Verlust der Enzymaktivität (68).

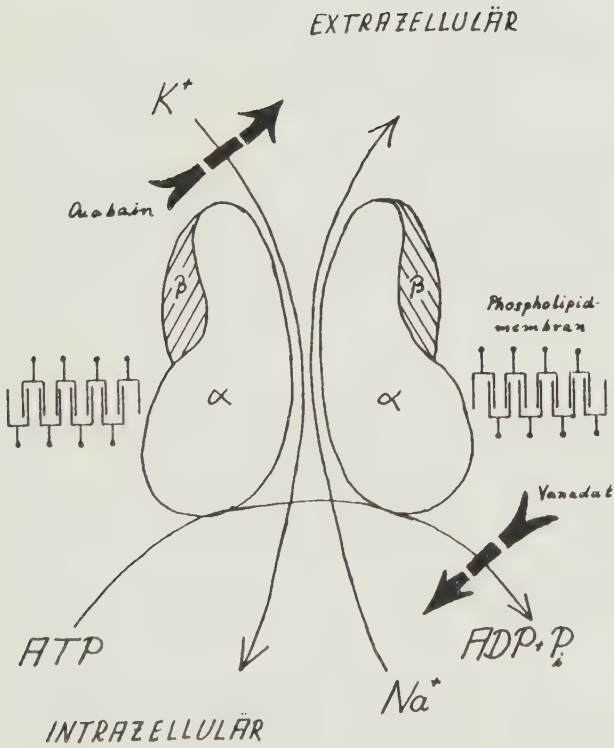


Abb. 1: Funktion eines $\alpha_2\beta_2$ -Oligomers der Na-K-ATPase in seiner Mikro-Umgebung.

—: normaler Ablauf. —: Inhibition

In hochgereinigten Präparationen der Na-K-ATPase ergab sich für ATP unter optimalen Bedingungen eine Wechselzahl von 167 sec^{-1} pro Na-K-ATPase Molekül (42).

Alle Substratbindungsstellen befinden sich auf der α -Einheit; die von ATP und Orthophosphat liegen intrazellulär (95), bei Natrium und Kalium geht man unter physiologischen Bedingungen davon aus, daß Natrium sich intra- und Kalium extrazellulär anlagert (78).

Die Funktion der β -Einheit ist noch nicht bekannt, doch ist ihr Vorhandensein für die Enzymfunktion von Bedeutung, denn die Aktivität der Na-K-ATPase wird durch speziell gegen die β -Einheit gerichtete Antikörper bis zu 80% erniedrigt (17, 69).

Welche Konformationsänderungen das Enzym bei einem Transportzyklus durchläuft und wie die Kationen durch die Zellmembran geschleust werden, ist noch nicht genau bekannt. Es wurde aufgrund kinetischer Untersuchungen und den Bindungsstellen von Natrium, Kalium, ATP und Orthophosphat folgendes Modell entwickelt (Abb. 2).

Intrazelluläres Natrium aktiviert das Enzym zu $E1 \cdot \text{ATP} \cdot \text{Na}$, das unter Abgabe von ADP zum energiereichen $E1 \cdot \text{P} \cdot \text{Na}$ phosphoryliert wird und unter Übergehen in das energiereiche $E2 \cdot \text{P} \cdot \text{Na}$ auf der extrazellulären Seite Natrium abgibt. Extrazelluläres Kalium dephosphoryliert das Enzym zu $E2 \cdot \text{K}$, das unter Anlagerung von ATP über das Zwischenprodukt $E2 \cdot \text{ATP} \cdot \text{K}$ in das energiereichere $E1 \cdot \text{ATP} \cdot \text{K}$ übergeht. Dies wird unter intrazellulärer Kaliumabgabe und erneuter Natriumaufnahme wieder zu $E1 \cdot \text{ATP} \cdot \text{Na}$ (27, 43). Da jedes Molekül aus zwei α -Einheiten besteht, geht man davon aus, daß beide nach einem Flip-Flop Mechanismus um 180° phasenverschoben arbeiten, sodaß eine α -Einheit in energiereichem $E1 \cdot \text{P} \cdot \text{Na}$ Zustand ist, während sich die andere dann im energiereichen Zustand $E2 \cdot \text{K}$ befinden muß (8, 71).

Neben den Substraten sind auch Inhibitoren der Na-K-ATPase

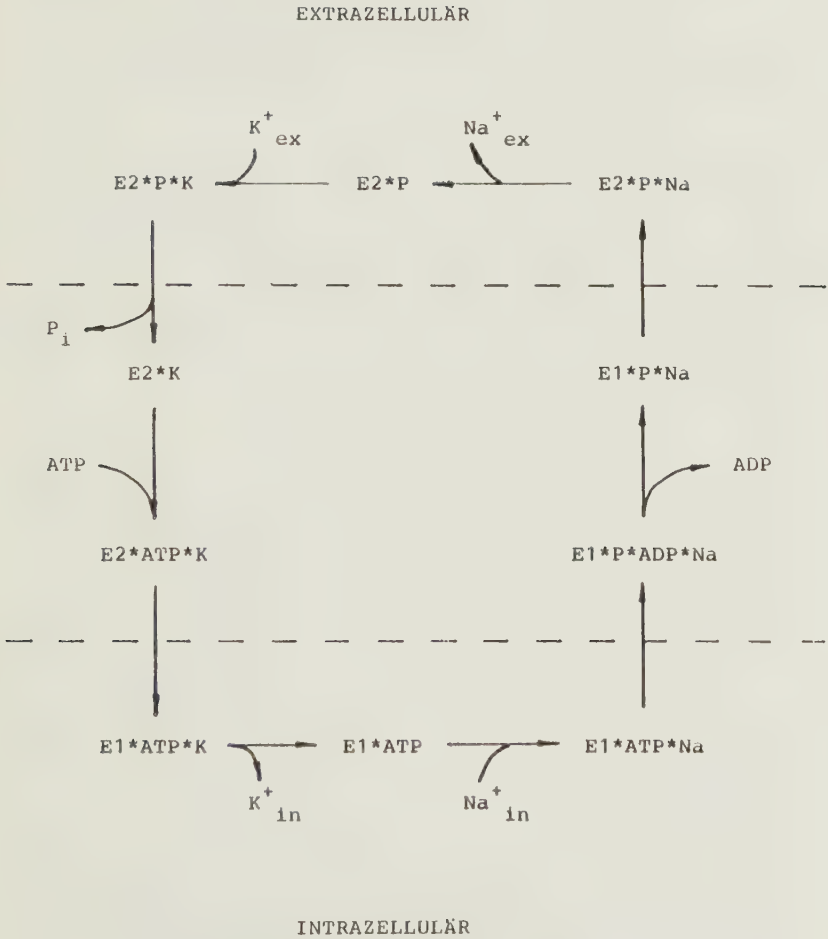


Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Zwischenstufen der Na-K-ATPase während eines Transportzyklus. E1: energiereiche Form. E2: energiearme Form.

bekannt, am bedeutendsten sind die Herzglykoside und Vanadat. Bei den Herzglykosiden wird fast ausschließlich Ouabain (= Strophantin G) verwendet. Sie entfalten ihre Wirkung extrazellulär auf der α -Einheit, indem sie dort, z. T. kompetitiv, die Kaliumbindungsstelle blockieren. Es gibt nur eine Bindungsstelle für die Herzglykoside (Ouabain-Bindungsstelle) pro $\alpha_2\beta_2$ -Einheit.

Vanadat wirkt wahrscheinlich aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit mit Orthophosphat, da es auch andere Phosphoenzyme wie die saure und alkalische Phosphatase, die Phosphofruktokinase und die Adenylatzyklase hemmt (75).

Es lagert sich intrazellulär an, wahrscheinlich an der F_1 -Bindungsstelle, und verhindert eine weitere Phosphorylierung des Enzyms.

1.2 Physiologische Funktion der Na-K-ATPase

Durch die Aufrechterhaltung bzw. Restaurierung der transmembranalen Natrium- und Kaliumgradienten unterstützt die Na-K-ATPase direkt oder indirekt eine große Zahl von Zellfunktionen, wodurch das Enzym für den gesamten Organismus von Bedeutung ist.

Die Höhe des Konzentrationsunterschiedes von Kalium über der Zellmembran bestimmt den absoluten Wert des Ruhepotentials der Zelle.

Von besonderer Bedeutung ist die Wiederherstellung des Ionenmilieus nach Depolarisierung an der Herzmuskelzelle (81). Neurone und Skelettmuskelzellen dagegen können nach Hemmung der Na-K-ATPase je nach Zelltyp noch bis zu hunderttausende Aktionspotentiale aussenden, sodaß die Na-K-ATPase hier nicht zur Wiederherstellung des Ionenmilieus nach jedem Aktionspotential zuständig ist (81).

Eine speziell für die Niere wichtige Funktion der Na-K-ATPase besteht in der indirekten Beteiligung an Cotransporten (Symporten und Antiporten) von Stoffen gegen deren Gradienten.

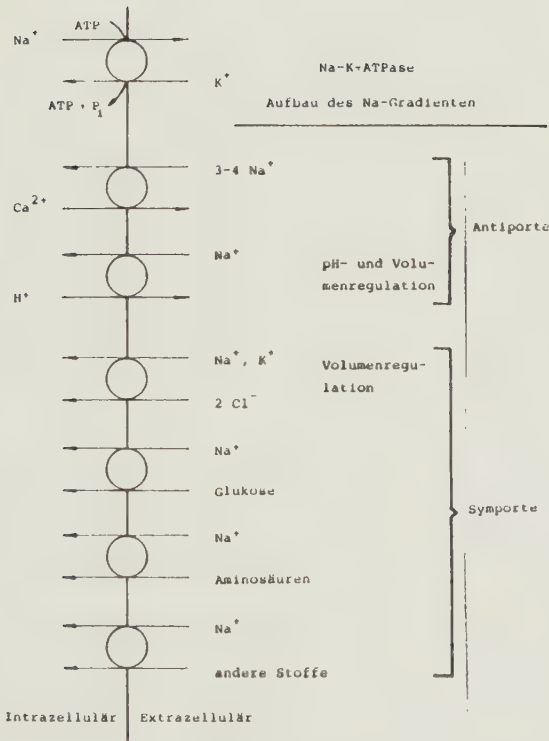


Abb. 3: Schematische Darstellung der Na-Gradienten-abhängigen Co-Transporte, die durch die Na-K-ATPase aufrechterhalten werden (81).

ten, die an den zelleinwärts gerichteten Natriumgradienten gekoppelt sind (Abb. 3).

Die erste Bedingung für diese Transportsysteme ist die kontinuierliche Aufrechterhaltung des Natriumgradienten durch die Na-K-ATPase. Weiterhin muß eine Permeabilität für Natrium vorhanden sein, damit es in die Zelle gelangen kann. Man vermutet, daß sich das Natrium an ein Carrier-Protein in der Zellmembran bindet und durch dieses entlang seines Gradienten in die Zelle gelangt. Ein Teil der dabei freiwerdenden Energie kann für den Cotransport eines Stoffes, der sich gleichzeitig an dem Carrier anlagert, benutzt werden.

Am Glucosetransport in die Zelle des Duodenums oder des proximalen Tubulus ist dies zum ersten Mal vermutet worden, denn die Hemmung der Na-K-ATPase mit Ouabain (9, 10) bzw. Fehlen von Natrium im Lumen (3, 70) brachten die Glucoseresorption zum Erliegen.

Die Aufnahme von Aminosäuren, Oligopeptiden, Vitaminen, Neurotransmittern und Kalium-/Natriumchlorid wurde ebenfalls als Symporte, der Heraustransport von Kalzium, Magnesium und Wasserstoffionen aus der Zelle als Antiporte identifiziert (Abb. 3).

Besondere Bedeutung kommt dabei der Abgabe von Wasserstoffionen für die zelluläre pH-Regulation, sowie in der Niere zur Ausscheidung von Säureäquivalenten in das Tubuluslumen zu. Diese hat zusätzlich mit dem Symport von Kalium-/Natriumchlorid in die Zelle Bedeutung für die Regulation des Zellvolumens, wobei der Mechanismus noch nicht ganz aufgeklärt ist (81).

Andere Funktionen der Na-K-ATPase, wie die Thermoregulation aufgrund einer bekannten Stimulation des Enzymes durch Triiodthyronin (50, 51, 55) oder der Blutdruckregulation durch den Natrium/Kalzium-Antiport sind noch nicht sicher definiert.

1.3 Verteilung, Funktion und Regulation der Na-K-ATPase im Nephron

Das Aktivitätsprofil der Na-K-ATPase entlang des Säugetier-nephrons ist bei den meisten Spezies ähnlich. Die höchste spezifische Aktivität befindet sich in den distalen Segmenten, der dicken, aufsteigenden Henle'schen Schleife im Mark (MAL) bzw. im Cortex (CAL) und dem distalen Konvolut (DCT), während im proximalen Konvolut (PCT) nur noch die Hälfte, in den Sammelrohren von Mark (MCT) bzw. Cortex (CCT) und dem geraden, proximalen Tubulus (PST) ein Viertel und in den dünnen Teilen der Henle'schen Schleife ein verschwindend geringer Teil dieser Aktivität vorhanden ist (Abb. 4). Die verschiedenen Aktivitäten sind den Aufgaben der Na-K-ATPase in den einzelnen Segmenten angepaßt.

Im proximalen Tubulus werden zwei Drittel des Ultrafiltrates isoton resorbiert. Natrium gelangt passiv entlang seinem elektrochemischen Gradienten über die apikale Membran in die Zelle und wird auf der basolateralen Seite durch die sich dort befindende Na-K-ATPase aktiv in das Interstitium transportiert (3, 11, 81), das mit den Blutkapillaren in enger Verbindung steht.

Die Na-K-ATPase dient hier neben der aktiven Resorption von Natrium (ca. 30% der in diesem Segment resorbierten Menge), dem passiv Wasser durch die hohe Wasserpermeabilität nachfolgt, vor allem der Aufrechterhaltung des Natriumgradienten über die apikale Zellmembran; denn der proximale Tubulus kann seine umfangreichen Resorptionsvorgänge von Glucose, Aminosäuren, Sulfat und Bicarbonat bzw. die Sekretion von Ammoniak und Wasserstoff nur durch die in 1.2 erwähnten Natrium-Cotransport-Systeme verrichten (Abb. 5).

Im dicken, aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife ist neben dem distalen Konvolut die höchste Aktivität der Na-K-ATPase; in diesem Segment wird durch das Enzym die primäre Triebkraft, in Form des Na-K-Chlorid gekoppelten, aktiven

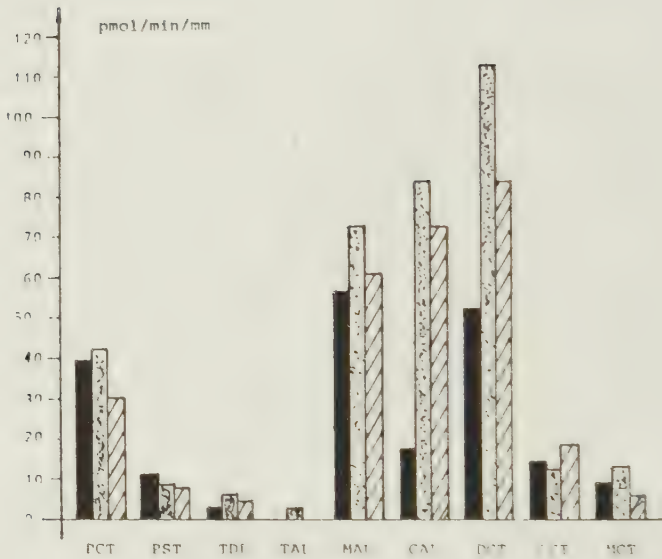


Abb. 4: Verlauf der Aktivitäten der Na-K-ATPase bei Kaninchen (■), Ratte (▨) und Maus (▧) entlang des Nephrons (44).

PCT: proximaler Tubulus, pars convoluta.

PST: proximaler Tubulus, pars recta. TDL:

Henle'sche Schleife, dünner, absteigender

Teil. TAL: Henle'sche Schleife, dünner,

aufsteigender Teil. MAL: Henle'sche Schleife, dicker, medullärer, aufsteigender Teil.

CAL: Henle'sche Schleife, dicker, kortikaler, aufsteigender Teil. DCT: distales Konvolut. CCT: kortikales Sammelrohr. MCT:

medulläres Sammelrohr.

Transportes, für den longitudinalen, osmotischen Gradienten des Gegenstromsystemes bereitgestellt.

Wie im proximalen Tubulus wird das passiv in die Zelle gelangte Natrium wiederum von der sich im basolateralen Labyrinth befindlichen Na-K-ATPase aktiv aus der Zelle heraustransportiert. Allerdings erfolgt hier kein passiver Wassereinstrom, da die apikale Membran annähernd wasserimpermeabel ist, sodaß das Natriumchlorid (hier besteht zusätzlich eine sekundär aktive Chloridresorption) hypertone resorbiert wird und die Tubulusflüssigkeit in gleichem Maße hypoton wird ("diluting segment"). Dieser Mechanismus ist der sogenannte Einzeleffekt des Gegenstromsystemes, mit dem in der Markspitze Konzentrationen bis zu 1200 mosm aufgebaut werden können (Abb. 5).

Im distalen Konvolut wird die aus der Henle'schen Schleife kommende Flüssigkeit so verändert, daß eine niedrige luminale Natriumkonzentration und eine hohe luminale Kaliumkonzentration eingestellt werden. Aufgrund der sich daraus ergebenden Ionengradienten über die apikale Zellmembran lassen sich die hohen Na-K-ATPase Aktivitäten einordnen.

In den Sammelrohren wird das in der Tubulusflüssigkeit enthaltene Natrium fast vollständig rückresorbiert und Kalium- bzw. Wasserstoffionen sezerniert. Die Volumenrückresorption wird dabei auf über 99% in Antidiurese eingestellt.

Die Resorptionsleistungen des proximalen Tubulus sind für Natrium, Kalium und Wasser, vermittelt durch die glomerulotubuläre Balance, der Größe des Ultrafiltrates angepaßt (11).

Erst in den distalen Segmenten wird eine dem Bedarf des Organismus angepaßte, Natrium- und Wasserresorption bzw. Kalium- und Wasserstoffsekretion durchgeführt.

Die Regulation erfolgt dort hormonell, wobei den Nebennierenrindenhormonen (NNR-Steroide) allen voran dem Mineralocorticoid Aldosteron, eine zentrale Rolle zukommt (11).

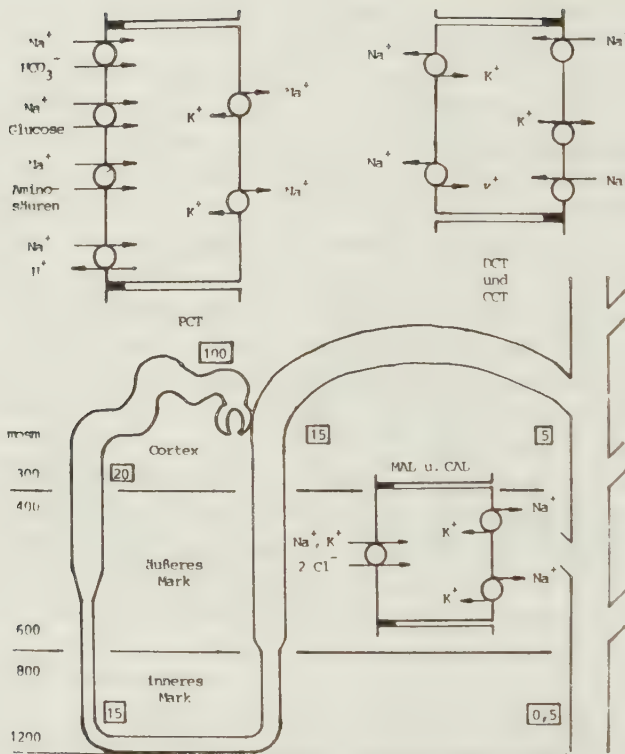


Abb. 5: Funktion der Na-K-ATPase im Nephron. Für die wichtigsten Segmente proximaler Tubulus (PCT), dicke, aufsteigende Henle'sche Schleife (MAL und CAL), distales Konvolut (DCT) und kortikales Sammelrohr (CCT) sind die Transportvorgänge der Zellen jeweils dargestellt. Im schematisch dargestellten Nephron bedeuten die Zahlen am Rand die Osmolarität im Interstitium und die eingerahmten Zahlen den prozentualen Anteil der Tubulusflüssigkeit vom Glomerulumfiltrat.

Die Wirkungen der NNR-Steroide über die Na-K-ATPase auf die Natriumresorption bzw. Kaliumsekretion und die Lokalisation der Nephronsegmente dieser Hormonwirkungen sind experimentell unter vier verschiedenen Aspekten untersucht worden:

- Auswirkungen von Natrium- und Kaliumzufuhr in den Organismus auf die Aldosteronkonzentration im Blutplasma und die Aktivität der Na-K-ATPase in den einzelnen Segmenten
- Änderungen der Aktivität der Na-K-ATPase des Nephrons nach Gabe von NNR-Steroiden
- Aktivitätsänderungen der Na-K-ATPase nach Adrenalectomie und erneuter Gabe von NNR-Steroiden
- Bindungsstudien der NNR-Steroide in den verschiedenen Nephronsegmenten.

Aldosteron besitzt eine antinatriuretische und kaliuretische Wirkung, die mit einer Änderung der Aktivität der Na-K-ATPase einhergeht.

Bei chronischer Verminderung des Natriumangebotes an den Organismus steigt sowohl die Aldosteronkonzentration im Plasma (28, 62, 64), als auch die Aktivität der Na-K-ATPase im kortikalen Sammelrohr an. Erfolgt zusätzlich ein chronisches Überangebot an Kalium, sodaß die Niere verstärkt ihre kaliumsekretorische Funktion ausüben muß, wird dieser Effekt auf Aldosteron und die Na-K-ATPase größer.

Ein chronisches Kaliumüberangebot alleine reicht ebenfalls zur Aktivitätserhöhung der Na-K-ATPase im kortikalen und medullären Sammelrohr aus, ohne jedoch die Aldosteronkonzentration des Plasmas zu verändern (13).

Eine alleinige Kaliumrestriktion zeigt im Gegensatz dazu eine Verminderung der Na-K-ATPase Aktivität im kortikalen Sammelrohr, ebenfalls ohne Auswirkung auf Aldosteron (29). Erhöhte Natriumaufnahme, bei normalem oder erniedrigtem Kaliumangebot, wirkt sich nicht auf die Aktivität der Na-K-ATPase aus, es kommt allerdings zu einer Abnahme der Aldosteronkonzentration (64, 78). Durch ein übergroßes Natrium- und sehr geringes Kaliumangebot kann die Plasmakonzentration

on von Aldosteron unter die Nachweisgrenze abgesenkt werden (24, 25).

Die Stimulation des Aldosterons hängt demnach nur vom Natriumbedarf des Organismus ab, wobei die Resorptionsleistung bei vermindertem Natriumangebot durch den Anstieg der Na-K-ATPase im kortikalen Sammelrohr erhöht wird, während die Regulation des Kaliums relativ unabhängig vom Aldosteron mit einer entsprechenden Änderung der Aktivität der Na-K-ATPase in dem selben Segment beantwortet wird.

Bei normalem Natrium- und Kaliumangebot bewirken Mineralocorticoidgaben sowohl Änderungen der Natriumresorption bzw. Kaliumsekretion in der Niere als auch der Na-K-ATPase Aktivität im Nephron. Nach drei Stunden tritt eine vermehrte Natriumresorption und Kaliumsekretion nach Gaben von Aldosteron oder Deoxycorticosteron (DOCA) in physiologischen Dosen auf. Bis zu diesem Zeitpunkt zeigt sich noch keine Änderung der Aktivität der Na-K-ATPase am distalen Konvolut oder dem kortikalen Sammelrohr (14).

Werden diese Hormone chronisch (länger als zwölf Stunden) verabreicht, tritt ein Anstieg der Na-K-ATPase im kortikalen Sammelrohr auf, während sich in den anderen Segmenten kein Effekt zeigt (28, 61, 63, 64). Die chronische Verabreichung von Glucocorticoiden hat keinerlei Wirkung auf die Na-K-ATPase im kortikalen Sammelrohr (64). Der Einfluß der Mineralocorticoide auf die Na-K-ATPase des kortikalen Sammelrohrs wird daraus zwar ersichtlich, jedoch läßt die zeitliche Diskrepanz zwischen der Wirkung auf die Ionenresorption und die Enzymaktivität nicht den Schluß auf eine von Anfang an durch die Na-K-ATPase gesteuerte Änderung der Resorptionsleistung zu.

Zur weiteren Beantwortung der Frage welche Mechanismen an akuten und chronischen Phasen der mineralocorticoiden Regulation beteiligt sind, wurden an adrenaletomierten Tieren

die Wirkungen von NNR-Steroiden untersucht.

Nach Adrenalektomie bildet der Körper keine Mineralo- und Glucocorticoide mehr, während die zum Teil in der Nebennierenrinde produzierten Sexualhormone weiterhin in den Gonaden gebildet werden können.

Mit dem Mangel an Steroiden tritt eine vermehrte Natriurese und eine verminderte Kaliumsekretion auf (18), die sich in einer erhöhten Kalium- und gleichbleibenden Natriumkonzentration des Plasmas zeigt (30).

Gleichzeitig beginnt in allen Nephronsegmenten bereits nach einem Tag eine unterschiedliche Abnahme der Na-K-ATPase Aktivität, die sich nach mehr als zwei Tagen nicht mehr ändert. Der größte Aktivitätsverlust mit 50-80% tritt im kortikalen Sammelrohr auf, was für eine hormonelle Regulation dieses Segmentes durch die NNR-Steroide spricht. Im medullären Sammelrohr, der Henle'schen Schleife und dem distalen Konvolut wird dagegen die Aktivität um 30-50% und im proximalen Tubulus nur um maximal 30% erniedrigt (18, 19, 40, 60, 66).

Bei erneuter, chronischer Gabe von Aldosteron nach Adrenalektomie zeigt sich eine Restaurierung der Aktivität der Na-K-ATPase im kortikalen Sammelrohr, während Glucocorticoide in diesem Segment keine Wirkung haben (Abb. 6, 60), sodaß eine mineralocorticoide Kontrolle angenommen werden kann. Im Gegensatz dazu wird die Aktivität der Na-K-ATPase im proximalen Tubulus, der Henle'schen Schleife und im distalen Konvolut durch die Gabe von Glucocorticoiden restauriert, was für eine glucocorticoide Kontrolle dieser Segmente spricht (30).

Akute Hormongaben nach Adrenalektomie, wobei die Wirkungs-dauer der Hormone kürzer als drei Stunden ist, machen ein völlig anderes Bild. Innerhalb dieser Zeit hat Aldosteron die Natriumresorption und die Kaliumsekretion wieder auf Werte nicht adrenalektomierter Tiere erhöht; beide Effekte sind durch den Aldosteronantagonisten Spironolakton hemm-

bar. Dexamethason hingegen bewirkt keine Antinatriurese, zeigt aber einen eigenständigen kaliuretischen Effekt wie Aldosteron, der nicht durch Spironolakton hemmbar ist (5, 7).

Über die Auswirkungen der Hormone auf die Na-K-ATPase bei akuter Gabe sind bisher unterschiedliche Ergebnisse vorhanden.

Einerseits werden überhaupt keine Effekte beider Hormone am kortikalen Sammelrohr nachgewiesen (14, 30, 61), andererseits wirken beide Hormone in diesem Segment. Aldosteron erhöht nach drei Stunden im kortikalen und medullären Sammelrohr die Aktivität der Na-K-ATPase während es im distalen Konvolut, der Henle'schen Schleife und dem proximalen Tubulus keine Wirkung hat (18, 19, 63, 66).

Dexamethason steigert in allen Segmenten, außer dem proximalen Tubulus, ebenso die Aktivität der Na-K-ATPase (19, 63). Die akute Wirkung von Aldosteron, aber auch von Dexamethason im kortikalen und medullären Sammelrohr ist durch Spironolakton hemmbar, sodaß Dexamethason einen mineralocorticoide Effekt zeigt. Dieser Effekt ist auf eine Affinität der Glucocorticoide für die Rezeptoren der Mineralocorticoide zurückzuführen, wobei die Rezeptorbindung durch das völlige Fehlen des Aldosterons nach Adrenalektomie erleichtert wird (60).

Die akute Aktivitätserhöhung im distalen Konvolut und Henle'scher Schleife durch Glucocorticoide ist durch Spironolakton nicht hemmbar und somit wie bei der chronischen Gabe von Glucocorticoiden ein rein glucocorticoider Effekt (19).

Neben den beschriebenen akuten Hormonwirkungen an adrenalectomierten Tieren, ist die Aktivität der Na-K-ATPase im kortikalen Sammelrohr von adrenalectomierten Kaninchen auch in vitro durch Aldosteron innerhalb einer Stunde restauriert worden (40).

Zusätzlich besteht ein Zusammenhang zwischen dem Natriumein-

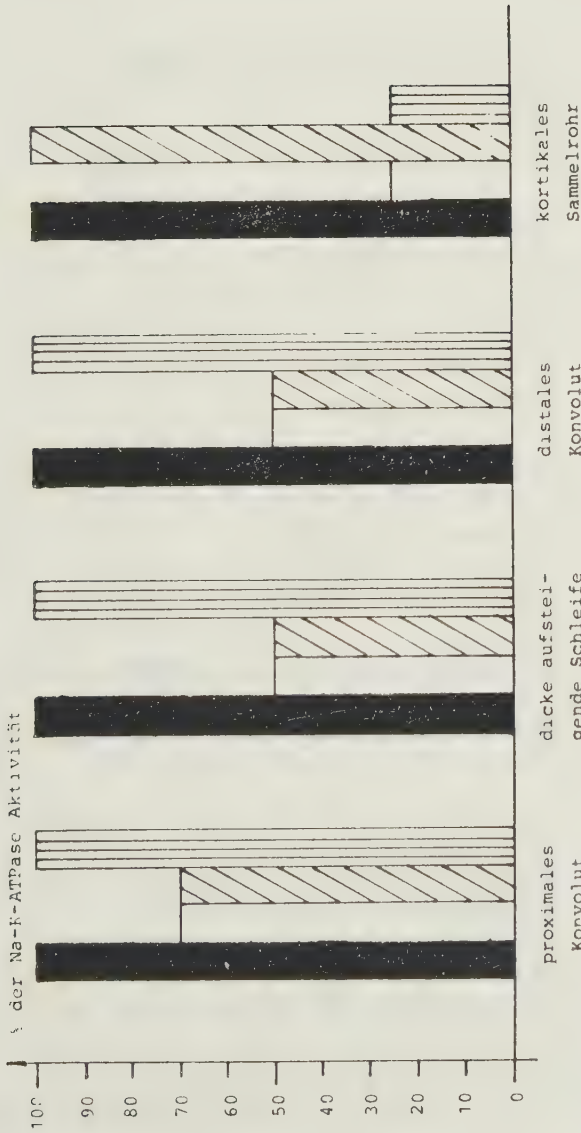


Abb. 6: Effekt chronischer Verabreichung von Aldosteron (30 mg/kg) und Dexamethason (60 mg/kg) auf die Aktivität der Na-K-ATPase in Nephronsegmenten adrenaletomierter Tiere.
(■): Kontrollwerte, (offene Balken): Adrenaletomie; (30, 60).

strom in die Zellen und der Na-K-ATPase im kortikalen Sammelrohr. Wird adrenaletomierten Tieren vor Gabe des Aldosterons Amilorid verabreicht, ist im Gegensatz zur alleinigen Hormonverabreichung dort kein Anstieg der Na-K-ATPase mehr feststellbar. Aldosteron erhöht am kortikalen Sammelrohr die Natriumpermeabilität der apikalen Zellmembran (72); dieser Effekt ist auch an der Froschhaut (2) und an dem Harnblasenepithel des Frosches (32) nachgewiesen worden.

Die genaue Lokalisation der Wirkungsorte der NNR-Steroide ist zusätzlich anhand von Rezeptorbindungsstudien mit radioaktiv markierten Hormonen in allen Segmenten durchgeführt worden. Grundsätzlich werden zwei Arten von Rezeptoren unterschieden, mineralocorticoide und glucocorticoide Rezeptoren.

Der Typ-I Rezeptor ist hochspezifisch für Mineralocorticoide und ist in allen distalen Segmenten einschließlich der Henle'schen Schleife, aber nicht im proximalen Tubulus vertreten. Er kommt am häufigsten im kortikalen Sammelrohr vor (15, 23, 24, 78). Der glucocorticoidspezifische Typ-II Rezeptor hat seine größte Dichte in den proximalen Tubuli, der Henle'schen Schleife und dem distalen Konvolut, weniger in den Sammelrohren (25, 58).

Diese Lokalisationen stimmen mit den Effekten der NNR-Steroide auf die Na-K-ATPase gut überein. Die mineralocorticoide Wirkung der Glucocorticoide am kortikalen Sammelrohr wird dadurch erklärt, daß jede der beiden Hormonarten im Überschuß die andere von ihrem spezifischen Rezeptor verdrängen kann.

Für den Wirkungsmechanismus des Aldosterons auf die Na-K-ATPase Aktivität wurden drei verschiedene Theorien entwickelt (Abb. 7):

1.) Permease-Theorie: Aldosteron bewirkt mit Hilfe einer Proteininduktion eine Erhöhung der apikalen Natriumpermeabi-

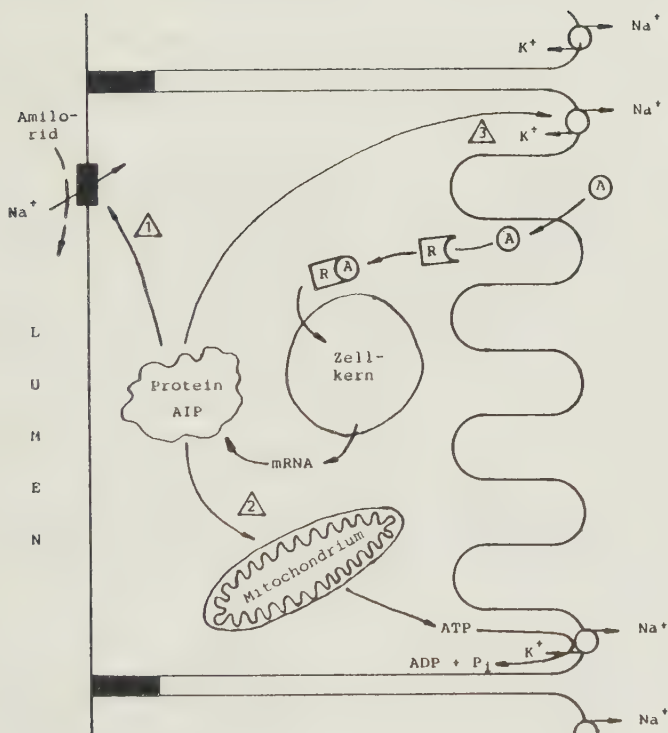


Abb. 7: Mögliche Wirkungsmechanismen von Aldosteron in der Epithelzelle des kortikalen Sammelrohres (66). (A): Aldosteron. [R]: cytosolischer Rezeptor. AIP: Aldosteron-Induziertes Protein. : luminaler Natriumkanal. : Hemmung. : Permease-Theorie. : Energie-Theorie. : Pumpen-Theorie.

lilität. Dafür spricht sowohl die Abhängigkeit der Na-K-ATPase Aktivität von Amilorid (66), als auch die Induktion von Proteinen durch Aldosteron, die in der Krötenharnblase beschrieben worden ist (4, 73). Zusätzlich wird die antinatriuretische, jedoch nicht die kaliuretische Aldosteronwirkung durch Aktinomycin D, einem Proteinsynthesehemmer, gehemmt (31).

2.) Energie-Theorie: Durch vermehrte Bereitstellung von ATP tritt eine Erhöhung der Wechselzahl pro Na-K-ATPase Molekül auf, die einer Michaelis-Menten Kinetik unterliegt ($v_{\max}$ wird bei einer ATP-Konzentration von mehr als 6 mM erreicht; 16). Die Induktion der Citratsynthetase, einem Enzym für die Energiegewinnung in den Mitochondrien, scheint durch Aldosteron im kortikalen Sammelrohr zu erfolgen (48, 56).

3.) Pumpen-Theorie: Aldosteron stimuliert die Synthese der Na-K-ATPase bzw. die Demaskierung latent vorhandener, funktionsuntüchtiger Pumpen. Die Erhöhung der Enzymaktivität im kortikalen Sammelrohr wird von einer Zunahme der Ouabainbindungsstellen begleitet (20).

Außer durch die NNR-Steroide ist auch eine Stimulation der Na-K-ATPase durch Schilddrüsenhormone bekannt. Im Nierencortex tritt nach Thyreoidektomie eine Abnahme der Aktivität der Na-K-ATPase auf. Erneute chronische Gaben von Triiodthyronin (T3) erhöhen sowohl die Enzymaktivität (50, 53), als auch die Zahl der α - und β -Einheiten der Na-K-ATPase (52, 54).

Neue Untersuchungen zeigen nach Thyreoidektomie ausschließlich eine Abnahme der Enzymaktivität im proximalen Tubulus (PCT und PST) und dem medullären sowie kortikalen Sammelrohr durch Verminderung der Pumpen.

Die erneute Gabe von Triiodthyronin bewirkt nach 48 Stunden in diesen Segmenten die Restaurierung der Enzymaktivitäten (1).

Inwieweit die unter 1.2 angesprochene Thermoregulation da-

durch in der Niere mitbestimmt wird, und wo sich im Nephron Rezeptoren für Schilddrüsenhormone befinden ist noch nicht geklärt.

1.4 Na-K-ATPase in gezüchteten Epithelzellen

Gezüchtete Epithelzellen sind hauptsächlich aus Nierenzell-suspensionen gewonnen worden, wie die A6-Zellen der Kröte, die LLC-PK₁-Zellen vom Schwein und die MDCK-Zellen vom Hund oder auch vom Harnblasenepithel der Kröte (TB-M oder TB-6c-Zellen). Es ist aber auch aus definierten Nephronsegmenten des Kaninchens gelungen, Kulturen zu züchten (39, 41).

Für die Experimente werden die Zellen auf speziellen Membranen gezüchtet, damit sie sich entsprechend der in vivo Situation apikal und basolateral, also polar, ausrichten können.

Bei fast allen Arbeiten über die Na-K-ATPase in Zellkulturen ist hauptsächlich die Lokalisation des Enzymes in der Zelle oder dessen Wirkung durch Ouabainbindung und Kation-transporte untersucht worden.

In den gezüchteten Zellen aus der kortikalen, dicken, aufsteigenden Henle'schen Schleife (82), den MDCK-Zellen (33) und den LLC-PK₁-Zellen (57) zeigt sich kein Vorkommen der Na-K-ATPase in der apikalen Membran, jedoch ist das Enzym wie bei den Nierenzellen in vivo an der basolateralen Seite vorhanden.

Ebenso ist in den LLC-PK₁-Zellen bei der Hemmung der Na-K-ATPase ein Natriumeinstrom und ein Kaliumausstrom aus der Zelle festzustellen (57) und zusätzlich zeigt diese Zellart einen natriumabhängigen Glucose-Cotransport in die Zelle; er ist wie beim proximalen Tubulus mit Ouabain, Phlorizin und fehlendem extrazellulären Natrium hemmbar (67).

Die Wirkungen der NNR-Steroide haben in den A6-Zellen den Nachweis von Aldosteron- und Corticosteronrezeptoren (80)

ergeben, wobei durch chronische Gaben von Aldosteron und akute Gaben von cAMP die Natriumpermeabilität gesteigert und der transepitheliale Widerstand gesenkt worden ist; beide Effekte sind wie an intakten Nierenzellen durch Amilorid hemmbar (65). Aldosteron und cAMP erzielen dieselbe Wirkung auch an den TB-M- und TB-6c-Zellen (35).

Wirkungen der NNR-Steroide auf die Na-K-ATPase Aktivität in gezüchteten Epithelien wurden bisher nicht untersucht.

1.5 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll eine weiterentwickelte Methode zur Aktivitätsbestimmung der Na-K-ATPase für Nephronsegmente und Kulturen aus definierten Nephronsegmenten dargestellt werden.

Zunächst sind Messungen der Na-K-ATPase Aktivität am kortikalen Sammelrohr des Kaninchens durchgeführt worden, um diese mit den dort durch andere Bestimmungsmethoden erhaltenen Befunde vergleichen zu können.

Danach ist die hormonelle Beeinflussung der Aktivität der Na-K-ATPase in gezüchteten Epithelverbänden aus kortikalen Sammelrohren von Kaninchen untersucht worden. Besonderer Betrachtung sind die Hormone Aldosteron, Dexamethason und Triiodthyronin unterzogen worden, um ihre Wirkungen auf die in vitro gewachsenen Epithelzellen mit denen auf die in vivo gewachsenen Sammelrohrzellen zu vergleichen.

2. Methodik

2.1 Entnahme des Nierengewebes

Als Ausgangsmaterial für die Messung der Na-K-ATPase wurden die kortikalen Sammelrohre der Nieren von Kaninchen (New Zealand) verwendet.

Die Enzymbestimmung wurde sowohl an Sammelrohren, als auch an Zellkulturen, die aus Sammelrohren gezüchtet worden waren durchgeführt. Sammelrohre, die zur Zellzüchtung verwendet wurden, waren aus Nieren von Kaninchen, deren Körpergewicht 0,7 - 1,2 kg betrug, entnommen worden. Für die Messung der Na-K-ATPase in den Sammelrohren selbst war zusätzlich eine zweite Gruppe von Tieren mit einem Körpergewicht von mehr als 1,5 kg verwendet worden.

Alle Tiere erhielten das gleiche Futter und hatten freien Zugang zu Leitungswasser.

Zur Gewebsentnahme wurde das Tier mit einem Schlag ins Genick getötet, und mit einem lateralen Schnitt unter dem Rippenbogen das Nierenlager eröffnet. Die Niere wurde in situ dekapsuliert, am Hilus abgetrennt und das Organ entnommen. Mit einem Skalpell wurde ein mit der Spitze zum Hilus gerichteter, radiärer Gewebsteil abgetrennt, aus dem dann die einzelnen Sammelrohre durch Mikrodissektion entnommen wurden.

2.2 Medien und Lösungen

Für die Mikrodissektion:

- Dissektionsmedium I : NaCl 115 mM; CaCl_2 1 mM; MgSO_4 1,2 mM; Na-Acetat 10 mM; NaH_2PO_4 1,2 mM; Dextrose 5,5 mM; pH = 7,4 durchperlt mit 95 Vol% O_2 und 5 Vol% CO_2 .

- Dissektionsmedium II: Click-RMPI-Medium (Zusammensetzung s. Tab. 1); Kanamycin 780 mg/l; Gentamycin 500 mg/l.

Für die in vitro Züchtung der Sammelrohrzellen:

- Nährmedium: HAM F12-Medium (Zusammensetzung s. Tab. 2) und Click-RMPI-Medium 1:1; Hepes-Puffer 10 mM; NaHCO_3 12 mM; db-cAMP 0,5 mM; Insulin 5 $\mu\text{g/ml}$; Selenoxid 0,5 mM; PgE_1 25 ng/ml; Humantransferrin 5 $\mu\text{g/ml}$; Penicillin 100 IU/ml; Streptomycin 100 mg/ml; 3% fetales Kälberserum (FCS).

Für die Na-K-ATPase Bestimmung:

- Lösung A : Imidazol 2 mM; pH = 7,4.
- Lösung B : Imidazol 2 mM; Ouabain 4 mM; pH = 7,4.
- Lösung C : NaCl 200 mM; NH_4Cl 130 mM; MgCl_2 2 mM; EGTA 0,2 mM; ATP 2 mM; Imidazol 50 mM; $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{-ATP}$ 20 - 40 $\mu\text{Ci/ml}$; pH = 7,4.
- Lösung D : Lösung C ohne NH_4Cl .
- Lösung E : Lösung C ohne NH_4Cl und ohne NaCl .
- Lösung 1 : Na_3PO_4 2 mM; HClO_4 200 mM.
- Lösung 2 : $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 16,2 mM; Triethylamin 50 mM; pH = 5,0.
- Lösung 3 : $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 4,05 mM; Triethylamin 50 mM; HClO_4 240 mM.

Herkunft der Substanzen:

- HAM F12 : Seromed (Berlin)
- Click-RMPI : Seromed (Berlin)
- $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{-ATP}$: New England Nuclear (NEN; Boston, USA)
- Reagentien für die Enzymmessung : Sigma (Taufkirchen, BRD) und Merck (Darmstadt, BRD); reinst und pro analysi.

NaCl	7000,0	L-Alanin	17,8
KCl	400,0	L-Arginin	100,0
Na ₂ HPO ₄	425,0	L-Arginin·HCl·H ₂ O	157,5
KH ₂ PO ₄	30,0	L-Asparagin	51,4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	150,0	L-Asparaginsäure	36,6
CaCl ₂	70,0	L-Cystin	55,0
Ca(NO ₃) ₂	34,8	L-Glutamin	442,0
		L-Glutaminsäure	39,4
Glucose	1500,0	Glycin	20,0
Phenolrot	7,5	L-Histidin	7,5
NaHCO ₃	1175,0	L-Histidin·HCl·H ₂ O	55,3
		L-Hydroxyprolin	10,0
Glutathion	0,5	L-Isoleucin	90,0
Biotin	0,1	L-Leucin	90,0
Vitamin B ₁₂	0,0025	L-Lysin·HCl	111,3
D-Ca-Pantothenat	1,125	L-Methionin	26,3
Cholinchlorid	2,5	L-Phenylalanin	47,5
Folsäure	1,5	L-Prolin	33,0
i-Inosit	19,5	L-Serin	36,0
Nicotinamid	1,5	L-Threonin	70,0
p-Aminobenzoesäure	0,5	L-Tryptophan	15,0
Pyridoxin·HCl	0,5	L-Tyrosin	55,0
Pyridoxal·HCl	1,0	L-Valin	67,5
Riboflavin	0,2		
Thiamin·HCl	0,2		
Adenosin	12,5		
Guanosin	12,5		
Uridin	12,5		
Cytosin	12,5		

Tab. 1: Zusammensetzung des Mediums Click-RMPI. Alle Mengen sind in mg/l angegeben.

NaCl	7500,0	D-Glucose	1802,0
KCl	223,6	Na-Pyruvat	110,0
Na ₂ HPO ₄	142,0	Phenolrot	1,2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	44,0	NaHCO ₃	1176,0
MgCl ₂ ·6H ₂ O	122,0		
		L-Alanin	9,0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,834	L-Arginin·HCl	211,0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,00249	L-Asparagin	13,2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,863	L-Asparaginsäure	13,3
		L-Cystein·HCl	31,5
Biotin	0,00730	L-Glutamin	146,0
D-Ca-Pantothenat	0,48	L-Glutaminsäure	14,7
Cholinchlorid	14,0	Glycin	7,5
Folsäure	1,3	L-Histidin·HCl·H ₂ O	21,0
l-Inosit	18,0	L-Isoleucin	4,0
Nicotinsäureamid	0,037	L-Leucin	13,0
Pyridoxin·HCl	0,062	L-Lysin·HCl	36,5
Riboflavin	0,038	L-Methionin	4,47
Thiamin·HCl	0,34	L-Phenylalanin	5,0
Vitamin B ₁₂	1,36	L-Prolin	34,5
Hypoxanthin	4,1	L-Serin	10,5
Thymidin	0,73	L-Threonin	12,0
Liponsäure	0,21	L-Tryptophan	2,0
Linolsäure	0,21	L-Tyrosin	5,4
Putrescin·2HCl	0,161	L-Valin	11,7

Tab. 2: Zusammensetzung des Mediums HAM F12. Alle Mengen sind in mg/l angegeben.

2.3 Probenvorbereitung der Nephronsegmente

2.3.1 Dissektion der Sammelrohre

Der entnommene Gewebeschnitt wurde in eine Petrischale gelegt, deren oberer Rand bündig mit der Arbeitsfläche abschloß. Die Schale wurde durch ein thermostatisiertes Kühlsystem während der Dissektion auf einer Temperatur von +4 °C gehalten. In der Schale befand sich Dissektionsmedium I, das mit Carbogen (95 Vol% O₂ und 5 Vol% CO₂) durchperlt wurde.

Unter einem Stereomikroskop (Wild Heerbrugg, Schweiz) wurden mit zwei spitzen und speziell geschliffenen Pinzetten (Dumont Nr. 5; Schweiz) die kortikalen Sammelrohre von 0,5 - 1,5 mm aus dem Gewebe disseziert (Abb. 8).

2.3.2 Messung der Tubuluslänge

Die Länge der Tubuli wurde photographisch bestimmt. Bei gleicher Vergrößerung wurden die einzelnen Tubuli und ein Maßstab (0,05 mm Abstand pro Skalenteil) abgelichtet (Abb. 8). Von der Photographie des Maßstabes wurde eine Längeneinheit mit dem Stechzirkel abgenommen und mit diesem auf den Photos der Tubuli die Segmente Stück für Stück abgegangen.

Aus dem Produkt der Stechzirkelschritte pro Tubulus und der dem Maßstab entsprechenden Zirkelweite ergab sich die Tubuluslänge in Millimetern.

Die darauf erfolgte Bestimmung der Na-K-ATPase ist unter 2.5 beschrieben.

2.4 Probenvorbereitung der Zellkulturen

2.4.1 Dissektion der Sammelrohre

Sämtliche Arbeitsgänge für die in vitro Züchtung von Sammel-

rohrepithelien wurden in einem aseptischen Raum unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Petrischale, das Kühlsystem und das Stereomikroskop waren in einer speziellen Laminarstromwerkbank eingebaut.

Der Gewebeschnitt wurde in die Petrischale hineingelegt, die steriles Dissektionsmedium II enthielt.

Der Dissektionsvorgang war derselbe, wie unter 2.3.1 beschrieben; die Tubuli wurden jedoch nur in einer Länge von 0,5 - 1,0 mm disseziert (Abb. 8).

2.4.2 Primärkulturen von Zellen des kortikalen Sammelrohres

Die so dissezierten Tubuli wurden in Gewebekulturschalen (Petriperm; Heraeus; Hanau, BRD) übertragen.

Die Schalen bestehen aus einem Kunststoffring ($\phi = 6$ cm), der mit einer gasdurchlässigen Teflonfolie als Schalenboden überspannt ist und durch einen Kunststoffdeckel abgeschlossen wird.

In der Mitte des Schalenbodens wurde am Tag vor der Dissektion ein 20 μ l-Tropfen einer wässrigen Fibronektinlösung (0,1 g/l) aufgebracht. Der Fibronektintropfen befand sich innerhalb eines Teflonringes ($\phi = 11$ mm; Höhe = 5 mm), der seitlich mit zwei horizontalen Bohrungen versehen ist (Abb. 8). Die Schalen blieben acht bis zehn Stunden unter UV-Licht, bis der Tropfen verdampft war, und sich das Fibronektin auf dem Schalenboden feinkristallin angelagert hatte.

Der dissezierte Tubulus wurde mit einer Dissektionspinzette in die Gewebekulturschale übertragen und an das Fibronektin angeheftet. Die Basalmembran des Tubulus wurde an mehreren Stellen durch eine Branche der Pinzette eröffnet.

In jede Gewebekulturschale wurde nur ein Tubulus übertragen. Dazu wurden 2,5 ml des Nährmediums oder des Nährmediums mit einem oder mehreren Hormonen zugegeben.

Die so vorbereiteten Gewebekulturschalen wurden während

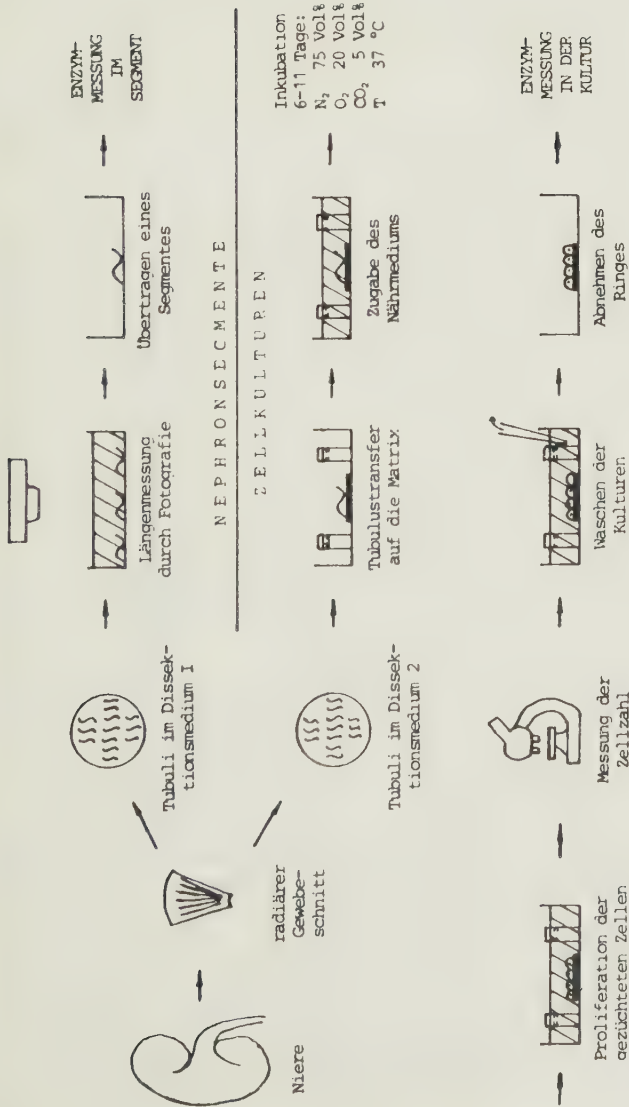


Abb. 8: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung von Nephronsegmenten und Zellkulturen für die Enzymmessung.

sechs bis elf Tagen in einem Brutschrank (Heraeus; B 5060 O₂/CO₂) inkubiert. Die Atmosphäre hatte folgende Zusammensetzung: 75 Vol% N₂; 20 Vol% O₂; 5 Vol% CO₂; Temperatur 37 °C und 100% relative Luftfeuchtigkeit. Das Medium wurde an jedem zweiten Tag erneuert.

2.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Bei allen Kulturen wurde vor dem Beginn der Messung die Zellzahl pro Schale bestimmt.

Mit einem inversen Stereomikroskop (Nomarski Optik, Zeiss IM 35; Oberkochen, BRD) wurde jede Kulturschale erst auf eine homogene Zelldichte und einen einheitlichen Zelltyp (kein zusätzliches Auftreten von anderen Zellarten, wie z.B. Fibroblasten) hin untersucht und jede inhomogene Kultur sofort verworfen.

Die Zellzählung, die mit einem Spezialokular, das ein Raster von zehn mal zehn Quadranten enthielt, durchgeführt wurde, teilte sich in zwei Arbeitsgänge auf.

Zuerst wurde die Kulturgröße durch Abfahren der gesamten Kulturfläche mit dem Raster als Zahl der innerhalb dieser Fläche enthaltenen Quadranten bestimmt.

Als zweites wurde bei gleicher Vergrößerung an fünf bis acht zufällig gewählten Stellen jeweils die Anzahl der Zellen in einem Quadranten ausgezählt und daraus die mittlere Zelldichte pro Quadrant ermittelt.

Die Zellzahl pro Kultur errechnete sich aus dem Produkt der Gesamtquadrantenzahl des Monolayer und der mittleren Zelldichte pro Quadrant. Messungen der Zellzahlen durch zwei Personen ergaben eine Fehlerbreite von ± 5%.

2.4.4 Hormonelle Zusammensetzung des Nährmediums

Es wurden insgesamt vier verschiedene Versuchsreihen durchgeführt (Abb. 9).

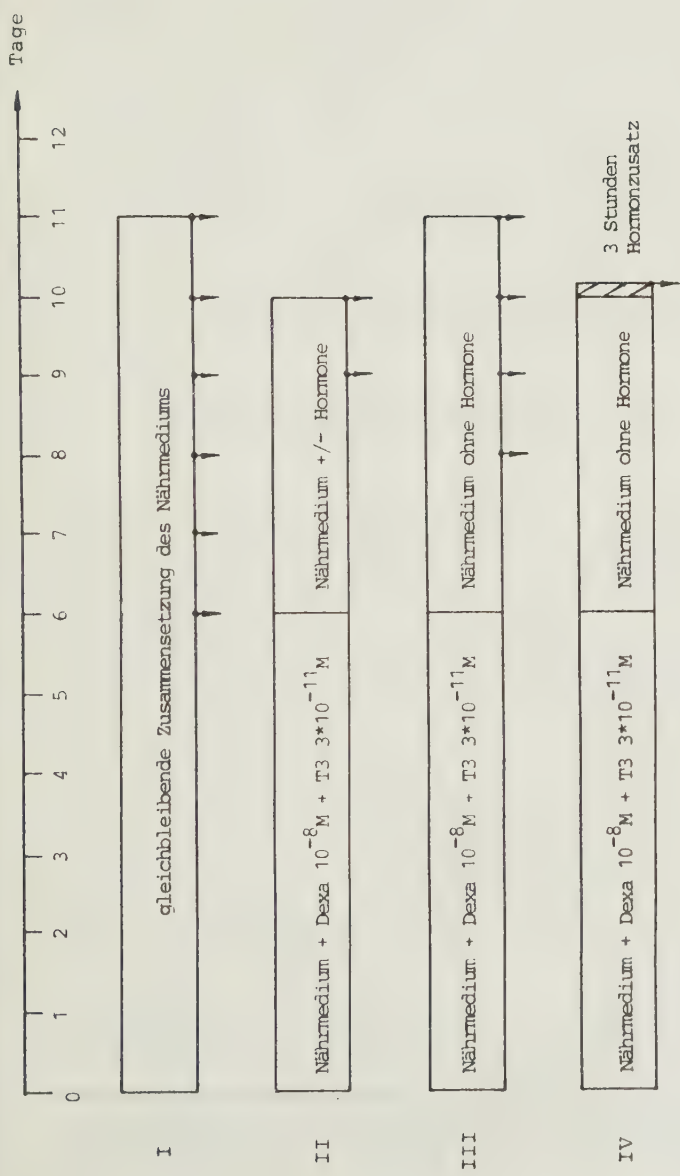


Abb. 9: Schematische Darstellung der Versuchsserien, die an den gezüchteten Sammelrohrzellen durchgeführt wurden. Die in I, II und IV verwendeter Hormonzusätze zum Nährmedium sind im Text beschrieben.
 ■ : Induktion. (3h) durch erneuten Hormonzusatz in Nährmedium.

In der Versuchsreihe I wurde den gezüchteten Zellen von der Implantation des Tubulus bis zum Meßtag, nach sechs bis elf Tagen, das gleiche, ihnen zugeordnete Medium gegeben. Es wurde der Einfluß von sechs verschiedenen Hormonsubstitutionen untersucht, wobei das Nährmedium durch den Zusatz von Aldosteron, Dexamethason, Triiodthyronin (T3) oder einer Kombination aus diesen drei Hormonen modifiziert wurde. Folgende Medien wurden verwendet:

- Nährmedium ohne Zusatz
- " und Dexamethason 10^{-8} M
- " und Aldosteron 10^{-9} M
- " und Aldosteron 10^{-6} M
- " und T3 $3 \cdot 10^{-11}$ M
- " und Dexamethason 10^{-8} M und T3 $3 \cdot 10^{-11}$ M
- " und Aldosteron 10^{-6} M und T3 $3 \cdot 10^{-11}$ M

In der Versuchsreihe II wurden alle Kulturen zunächst für sechs Tage im Nährmedium, das zusätzlich Dexamethason 10^{-8} M und T3 $3 \cdot 10^{-11}$ M enthielt, gezüchtet. Danach wurde das Medium entfernt und zu jeder Kultur für weitere drei bis vier Tage ein anderes Medium gegeben. Auch hier wurden wieder sieben verschiedene Medien untersucht:

- Nährmedium ohne Zusatz
- " und T3 $3 \cdot 10^{-8}$ M
- " und Dexamethason $2 \cdot 10^{-7}$ M
- " und Aldosteron 10^{-9} M
- " und Aldosteron 10^{-7} M
- " und Aldosteron 10^{-6} M
- " und Aldosteron 10^{-7} M und Dexamethason $2 \cdot 10^{-7}$ M

In der Versuchsreihe III wurde die vorherige Versuchsreihe (II) erweitert, indem der zeitliche Verlauf der Aktivität der Na-K-ATPase nach der Hormonverarmung gemessen wurde. Dazu wurden die Kulturen sechs Tage lang mit Nährmedium und Dexamethason 10^{-8} M und Triiodthyronin $3 \cdot 10^{-11}$ M vorgezücht-

tet. Danach wurde dieses Medium durch Nährmedium ohne hormonelle Zusätze ersetzt, und die Aktivität der Na-K-ATPase nach zwei, drei, vier oder fünf Tagen gemessen.

In der Versuchsreihe IV wurden die Kulturen wie in Versuchsreihe III sechs Tage lang vorgezüchtet und für weitere drei bis fünf Tage mit Nährmedium ohne hormonelle Zusätze gefüttert. Am Tag der Messung wurde den Kulturen für drei Stunden erneut hormonsubstituiertes Nährmedium zugesetzt und die Aktivität der Na-K-ATPase bestimmt. Hier wurden verwendet:

- Nährmedium und Aldosteron 10^{-9} M
- " und Dexamethason 10^{-8} M
- " und Dexamethason 10^{-8} M und Aldosteron 10^{-9} M.

2.5 Messung der Na-K-ATPase Aktivität

2.5.1 Übertragen des Segmentes in das Reaktionsgefäß

Die zur Na-K-ATPase Messung dissezierten Tubuli (s. 2.3.1) wurden in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml Plastikgefäß, Eppendorf; Hamburg, BRD) übertragen.

Jedes Gefäß enthielt nur ein Segment. Dazu wurde zunächst mit einer Dissektionspinzette ein Tubulus in eine Petrierschale gelegt. Die dabei zwischen den Branchen der Pinzette mitgenommene Menge an Dissektionsmedium I wurde mit einem saugfähigen Zellstoff unter dem Mikroskop entfernt, ohne jedoch dabei den Tubulus zu berühren.

Nun wurden entweder 10 µl Lösung A für die Bestimmung der Gesamt-ATPase, oder 10 µl Lösung B für die Bestimmung der Mg-ATPase, auf den Tubulus pipettiert (Abb. 10).

Mit derselben Pipette wurde der Tropfen mit dem Tubulus wiederaufgenommen und in das Reaktionsgefäß übertragen.

Zur Bestimmung der Leerwerte wurden in drei Reaktionsgefäße je 10 µl Lösung A und in drei weitere Reaktionsgefäße je 10 µl Lösung B pipettiert.

2.5.2 Übertragen der gezüchteten Zellen in das Reaktionsgefäß

Das Nährmedium wurde nach der Zellzählung aus der Gewebekulturschale abpipettiert und diese zweimal mit je 2,5 ml Aqua bidest. ausgespült.

Nach dem Abnehmen des Teflonringes wurde unter dem Mikroskop ein 10 mm breiter, 15 - 20 mm langer Teflonstreifen aus dem Boden der Schale herausgeschnitten. Verbliebene Flüssigkeit wurde auch hier vom Teflonstreifen abgesaugt.

Der Teflonstreifen wurde mit einer Dissektionspinzette gefaßt und längsseits in das Reaktionsgefäß hineingelegt. Nun wurde auf die Kulturen entweder 10 µl Lösung A oder 10 µl Lösung B pipettiert. Alle Reaktionsgefäße wurden waagrecht gelagert, um ein Abfließen der Lösungen zu vermeiden.

Bei der Leerwertbestimmung wurde genauso verfahren, wie unter 2.5.1 beschrieben.

2.5.3 Hyposmotischer und thermischer Schock

Von diesem Zeitpunkt an war der Analysengang für beide Gewebearten, sowohl die Tubuli, als auch die Zellkulturen gleich. Im weiteren Verlauf werden deshalb beide als Proben bezeichnet.

Die Proben wurden sofort nach dem Aufpipettieren der Lösungen A oder B für 20 Minuten in einen Aluminiumkühlblock mit 0 °C gelegt. Während dieser Zeit führte die Hyposmolarität der beiden Lösungen und der darauf folgende Wassereinstrom in die Zelle zu einem Zerreißen der Zellmembran (hyposmotischer Schock).

Danach wurden die Proben in einen zweiten Aluminiumblock gebracht, der mit Trockeneis auf mehr als -40 °C gekühlt worden war. Dort verblieben sie für 2,5 Minuten und wurden dann in einem Thermostaten (Eppendorf Thermostat 5320) aufgetaut (thermischer Schock). Dieser thermische Schock wurde insgesamt siebenmal durchgeführt.

2.5.4 Inkubation, Reaktionsstop und Probennachbearbeitung

In jede Probe und in jedes Gefäß für die Leerwertbestimmung wurden die 10 µl Lösung C pipettiert. Zusätzlich wurden bei den Versuchen mit Nephronsegmenten von Tieren mit einem Gewicht von mehr als 1,5 kg weitere zwei Versuchsserien durchgeführt. Entweder wurden 10 µl Lösung D oder 10 µl Lösung E statt Lösung C dazugegeben.

Alle Gefäße wurden nun nochmals für 20 Minuten in einen Aluminiumblock bei 0 °C gelegt, damit sich die beiden 10 µl-Volumina durchmischten.

Die Endkonzentrationen in diesen 20 µl Inkubationslösung waren: NaCl 100 mM; NH₄Cl 65 mM; MgCl₂ 1 mM; ATP 1 mM; Imidazol 26 mM; EGTA 0,1 mM; 200 - 400 nCi (γ-³²P)-ATP und pH = 7,4.

In den Proben zur Bestimmung der Mg-ATPase sind zusätzlich 2 mM Ouabain enthalten. Die Endkonzentrationen bei den beiden Versuchen mit den Lösungen D und E sind mit den obigen bis auf das Fehlen von NH₄Cl in Lösung D und dem Fehlen von NaCl und NH₄Cl in Lösung E identisch.

Die Proben wurden bei +37 °C im Thermostaten inkubiert. Die Inkubationszeit betrug zwischen vier und 63 Minuten (Tab. 3). Die Inkubationszeit aller Leerwerte eines einzelnen Versuches entsprach der längsten Inkubationszeit der Proben im Versuch.

Die Reaktion wurde gestoppt indem je 500 µl kalter Lösung 1 und 2 (+4 °C) in das Reaktionsgefäß zugesetzt wurden, wodurch das gesamte Orthophosphat, sowohl das aus Lösung 1, als auch das vom ATP und (γ-³²P)-ATP abgespaltene, als schwerer, gelbgrüner Niederschlag ausfiel.

Die Proben wurden bei +4 °C fünf Minuten bei 9000 g zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5412) und der Überstand verworfen.

Um die verbliebene Radioaktivität des noch nicht abgenomme-

Kulturen Zellzahl	Ink.-Zeit in min.	
	Gesamt- ATPase	Mg- ATPase
0 - 2000	53	53
2000 - 4000	38	48
4000 - 7000	28	38
7000 - 12000	18	28
12000 - 30000	8	18
30000 - max.	4	8
Sammelrohr- segmente 0,5 - 1,5 mm	43	63

Tab. 3: Inkubationszeiten der Sammelrohr-segmente und der gezüchteten Zellen in Abhängigkeit von Tubuluslänge (mm) bzw. Zellzahl pro Kultur.

nen Überstandes zu entfernen, wurden 1000 µl Lösung 3 in das Gefäß gegeben, dieses fünf Minuten bei 9000 g zentrifugiert, und der Überstand erneut verworfen. Dieser Auswaschvorgang mit Lösung 3 wurde insgesamt viermal durchgeführt.

Zur Messung der Radioaktivität des im Niederschlag enthaltenen ^{32}P -Orthophosphates wurde 1 ml des Szintillators Aquasol-2 (New England Nuclear, NEN) in das Reaktionsgefäß gegeben. Der Niederschlag aus Molybdänphosphat wurde mit Ultraschall in der Szintillatorflüssigkeit gelöst und in ein Szintillatorzählröhrchen (Zinsser plastic vials 6 ml; Frankfurt, BRD) umgefüllt. Das Reaktionsgefäß wurde dann dreimal mit 1 ml Aquasol-2 ausgespült und jeweils dem Szintillatorzählröhrchen zugegeben.

2.5.5 Standards

Für die Herstellung der Standards wurde in zehn Szintillatorzählröhrchen je 4 ml Szintillator gefüllt und 10 µl der jeweils entsprechenden Reaktionslösung (C, D oder E) zugesetzt. Die Standards wurden in gleichmäßigen Abständen zwischen den Proben und den Leerwerten pipettiert.

2.5.6 Szintillationsmessung

Die Proben wurden im Beta-Counter (TRI-CARB 300 C; Packard, Downers Grove, Ill., USA) gemessen. Jede Probe wurde solange gezählt, bis die doppelte Standardabweichung der von der Probe während der gesamten Meßzeit abgegebenen Impulse ($2\sigma = 2 \cdot \sqrt{\text{Impulse}}$) kleiner als 0,1% war. Bei den verwendeten Aktivitäten betrug die Meßzeit unter diesen Bedingungen 1,5 - 5 Minuten.

2.5.7 Berechnungen

Die Aktivität der ATPase der einzelnen Probe errechnete

sich nach:

$$A = \frac{S - B}{Sta} \cdot \frac{a}{t \cdot n}$$

A	= (fmol/min/Zelle)	für Kulturen
A	= (pmol/min/mm)	für Nephronsegmente
S	= (cpm)	der Probe
B	= (cpm)	Mittelwert aus drei Leerwerten
Sta	= (cpm/nmol ATP)	Mittelwert aus zehn Standards
t	= (min)	Inkubationszeit
n	=	Zellzahl bei gezüchteten Zellen
n	= (mm)	Länge des Nephronsegmentes
a	= 10^6	in gezüchteten Zellen
a	= 10^3	in Nephronsegmenten

Die Aktivität der Na-K-ATPase ergab sich dann aus der Differenz der Mittelwerte der Gesamt-ATPase Aktivitäten (ohne Ouabain) und der Mg-ATPase Aktivitäten (mit Ouabain). Zum Vergleich der Na-K-ATPase Aktivitäten wurde der unpaarige t-Test verwendet.

2.6 Vorversuche

2.6.1 Einfluß der Probennachbereitung auf die Szintillationsmessung

Um den Einfluß des in der Szintillatorflüssigkeit gelösten Probenmaterials auf die Szintillationszählung (Quenching) zu untersuchen, wurde in zwei Szintillationsröhrchen mehrfach Molybdänphosphat zugegeben.

In zwei Szintillationsröhrchen wurden je 4 ml Aquasol-2 und je 10 µl Lösung C gefüllt und gezählt. Die jeweils gemessene Radioaktivität wurde als 100% relative "efficiency" bezeichnet, d.h. als Ausgangsaktivität für die nachfolgenden Messungen verwendet. Als Maß für das Quenching diente der

dimensionslose Quenchfaktor SIE, der sich aus dem Vergleich des Energiespektrums der Probe mit dem einer externen Radioquelle errechnet.

Der Quenchfaktor und die Radioaktivität im Szintillationsröhrchen wurden nach siebenmaliger Zugabe einer Lösung aus Molybdänphosphat und Aquasol-2 (à 10 µl) jeweils erneut gemessen.

Danach war die Gesamtmenge an Molybdänphosphat im Szintillationsröhrchen um etwa 40% größer als die in den Proben zur Na-K-ATPase Messung.

2.6.2 Zeitabhängigkeit des Leerwertes

Wie unter 2.5.4 angegeben, waren die Inkubationszeiten der Proben verschieden. Da nicht für jede Inkubationszeit ein eigener Leerwert mitbestimmt werden konnte, wurde in folgendem Vorversuch die Abhängigkeit des Leerwertes von der Inkubationszeit in vier Gruppen untersucht:

- Gruppe 1: 10 µl Lösung A und 10 µl Lösung C wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und das verbrauchte ATP nach 0, 18, 36, 54 und 72 Minuten bei einer Inkubationstemperatur von +37 °C gemessen.
- Gruppe 2: 10 µl Lösung B und 10 µl Lösung C wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und derselbe Versuch wie in Gruppe 1 durchgeführt.
- Gruppe 3: 10 µl Lösung A und 10 µl Lösung C wurden auf einen Teflonstreifen mit einem Fibronektinfleck gegeben und bei +37 °C der ATP Verbrauch nach 0, 36 und 72 Minuten bestimmt.
- Gruppe 4: Es wurde derselbe Versuch wie in Gruppe 3 mit 10 µl Lösung B und 10 µl Lösung C durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Einfluß der Probennachbereitung auf die Szintillationsmessung

Die kontinuierliche Zugabe des Molybdänphosphates zu dem im Aquasol-2 gelösten radioaktiven ATP bewirkte ein zunehmendes Quenching.

Der Quenchfaktor SIE, der vor der Zugabe des Molybdänphosphates einen Wert von 740 in Röhrchen 1 und 749 in Röhrchen 2 gehabt hatte, nahm mit jeder weiteren Pipettierung ab, bis er nach Zugabe von 70 μ l Molybdänphosphatlösung einen Wert von 395 erreichte.

Die am Beginn des Versuches und nach jeder Pipettierung gemessene Radioaktivität sank dabei von 100% relativer "efficiency" vor Zugabe des Molybdänphosphates auf 99,6% bzw. 99,15% der jeweiligen Ausgangsaktivität in beiden Röhrchen ab (Abb. 11). Daraus ergab sich, daß das im Szintillator gelöste Molybdänphosphat zwar ein beträchtliches Quenching der Proben verursachte, jedoch kein signifikanter Einfluß auf die Radioaktivitätsmessung bestand. Somit konnten alle Werte der Radioaktivitäten in einem Quenchbereich von 395 bis 749 ohne Korrekturfaktor direkt miteinander verglichen werden.

Die Standards hatten in allen Versuchen Quenchfaktoren von 700 bis 749 und die Proben von 450 bis 550, was einer relativen "efficiency" von mindestens 99,52% bei den Proben entsprach. Daher konnten diese Werte der Radioaktivitätsmessung direkt in die Formel zur Berechnung der ATPase Aktivität eingesetzt werden.

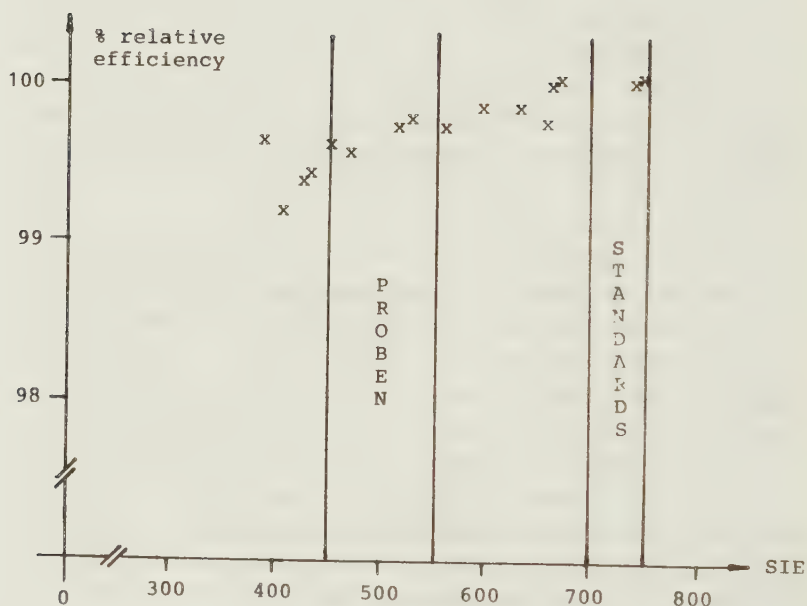


Abb. 11: Abhängigkeit der relativen Zählhausbeute (efficiency) vom Quenching durch Molybdänphosphat bei der ^{32}P -Messung. Es wurde der Szintillator Aquasol-2 und das Szintillationsröhrchen (Zinsser, plastic vials 6 ml) verwendet.

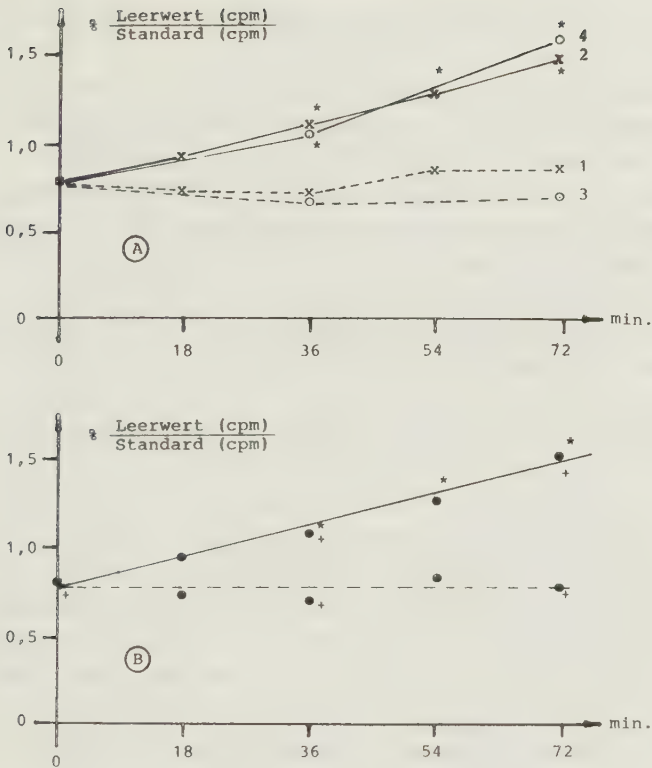


Abb. 12: Zeitabhängigkeit der Leerwerte. * = signifikanter Unterschied zum Wert bei 0 Minuten ($p < 0.05$).

A: Gesamt-ATPase 1 und 3 (---) und Mg-ATPase 2 und 4 (—) im Reaktionsgefäß (x) und auf fibronektinbeschichtetem Teflon (o).

B: Gesamt-ATPase (---) und Mg-ATPase (—). Die Daten für die Inkubationszeiten 0, 36 und 72 Minuten sind als Mittelwerte aus den Gruppen 1 und 3 bzw. 2 und 4 dargestellt (+).

3.1.2 Zeitabhängigkeit des Leerwertes

Die für die Leerwerte nach 0 Minuten Inkubationszeit gemessene Aktivität betrug in den vier Gruppen 0,77% der im Standard vorhandenen Ausgangsaktivität.

Mit zunehmender Inkubationszeit wichen die Werte der beiden Gruppen mit Ouabain (Gruppe 2 und 4) von den zwei Gruppen ohne Ouabain (Gruppe 1 und 3) ab.

Die Leerwerte der Gruppen ohne Ouabain (Leerwerte für die Gesamt-ATPase Bestimmung) blieben dabei während einer Inkubationszeit von 0 bis 72 Minuten auf einem nahezu konstanten Wert zwischen 0,62% und 0,86%. Es bestand dabei kein Unterschied zwischen den Messungen im Reaktionsgefäß und den Teflonstreifen (Abb. 12).

In den Gruppen, die Ouabain im Inkubationsmedium enthielten (Leerwerte für die Mg-ATPase Bestimmung), zeigte sich ein mit der Inkubationszeit linear zunehmender Anstieg der Leerwertaktivitäten. Nach 72 Minuten waren die Leerwerte von 0,77% auf 1,47% (Reaktionsgefäß) bis 1,57% (Teflonstreifen) gestiegen, wobei erneut kein signifikanter Unterschied zwischen Reaktionsgefäßen und Teflonstreifen bestand.

Dieser lineare Zusammenhang wurde durch eine Gerade

$$y = 0.0102 \cdot x + 0,74$$

mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,99$ beschrieben.

3.2 In vitro Züchtung von Sammelrohrepithelien

Die Entstehung einer Zellkultur aus gezüchteten Sammelrohr-epithelien durchlief mehrere Stadien.

Der auf dem auskristallisierten Fibronektin in der Kulturschale angeheftete Tubulus (Abb. 13a) wurde an mehreren Stellen an der Basalmembran verletzt.

Nur an diesen Verletzungsstellen begannen sich nach zwei

Tagen flächenhaft Zellverbände zu entwickeln, sodaß die Morphologie des Tubulus dort nicht mehr vorhanden war (Abb. 13b). Nach drei bis vier Tagen war der Tubulus vollständig verschwunden und eine Migration mit vermehrter Proliferation der Zellinseln zu beobachten.

Nach sechs Tagen bestand die Zellkultur dann aus einem lichtmikroskopisch homogenen Monolayer (Abb. 13c), der ab diesem Zeitpunkt für die Messung verwendet werden konnte, da sich keine morphologischen Veränderungen der Zellen mehr zeigten, und sich nur noch die Zellzahl durch die immer noch anhaltende Proliferation peripher erhöhte.

3.3 Morphologische Veränderungen der Zellen während der Schockphase

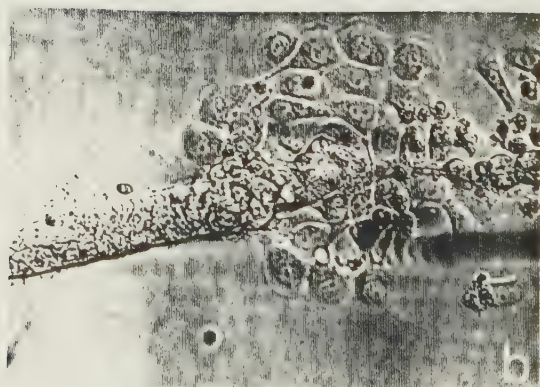
In den Abbildungen 14a bis 14d sind die lichtmikroskopischen Veränderungen während der verschiedenen Schockphasen zu erkennen. Nach 20 Minuten hyposmotischem Schock nahmen die Zellen eine zunehmend kugelige Form an. Gleichzeitig erhöhte sich das Zellvolumen durch den Wassereinstrom beträchtlich (Abb. 14b).

In der nun folgenden thermischen Schockphase setzte sich dieser Vorgang fort. Auf den Abbildungen sind die Zellen nach vier (Abb. 14c) und sieben (Abb. 14d) thermischen Schockphasen dargestellt.

Veränderungen von der vierten bis zur siebten thermischen Schockphase waren lichtmikroskopisch nicht mehr erkennbar.

3.4 Die Aktivität der Na-K-ATPase in Sammelrohrsegmenten

Die Gesamt-ATPase Aktivität in Segmenten von Tieren mit einem Körpergewicht von mehr als 1,5 kg betrug $58,23 \pm 5,45$ pmol/min/mm, die Mg-ATPase Aktivität war $26,07 \pm 4,03$ pmol/min/mm, woraus sich eine Aktivität der Na-K-ATPase von $32,16 \pm 6,77$ pmol/min/mm errechnete. Dieser Wert entsprach 55% der Gesamt-ATPase.



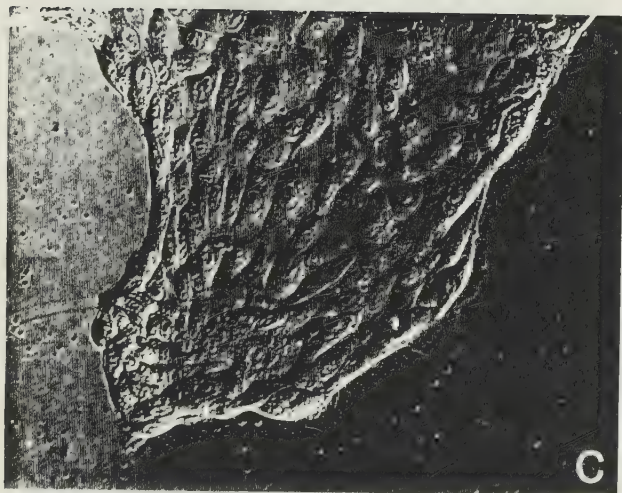
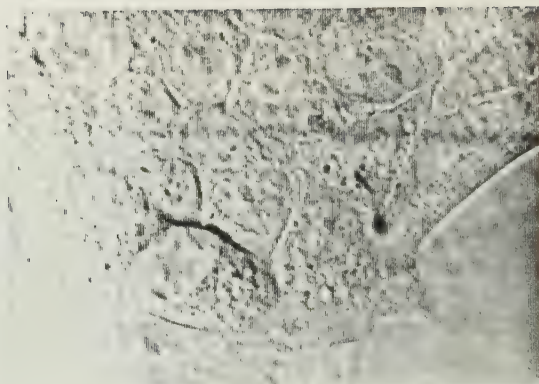


Abb. 13: Entstehung einer Zellkultur aus gezüchteten
Sammelrohrepithelien

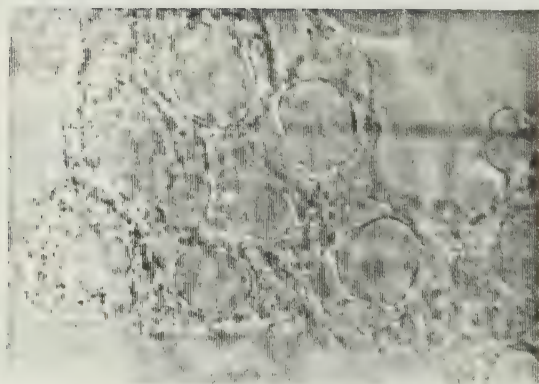
a: Tubulus

b: nach zwei Tagen an einer Verletzungsstelle der
Basalmembran entstandener Zellverband

c: homogener Monolayer aus gezüchteten Sammelrohr-
epithelien nach mindestens sechs Tagen Anzüchtung



(a)

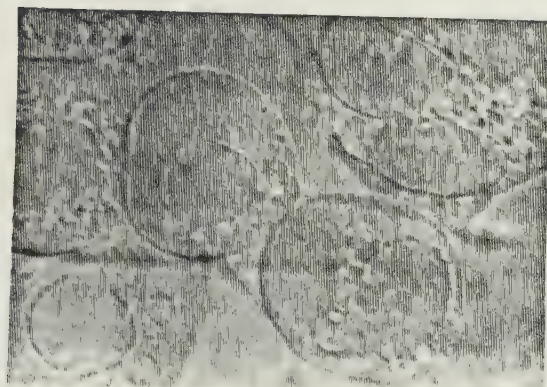


(b)

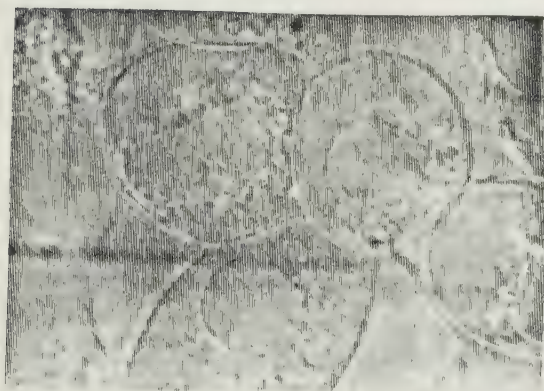
Abb. 14: Morphologische Veränderungen der Zellen während der Schockphasen

a: Gezüchtete Epithelien vor dem Schock

b: 20 Minuten hyposmotischer Schock bei 0 °C



c



d

c: vier thermische Schocks à 2,5 Minuten bei -40°C
d: sieben thermische Schocks à 2,5 Minuten bei -40°C

Wurden entweder NH_4^+ oder NH_4^+ und Natrium aus dem Inkubationsmedium entfernt, so wurde keine Na-K-ATPase Aktivität gemessen (Abb. 15). Die Werte für die Gesamt- und Mg-ATPase lagen zwischen $24,37 \pm 4,19$ und $37,02 \pm 12,73$ pmol/min/mm und waren somit in der Größenordnung der Mg-ATPase Aktivität des Versuches bei dem NH_4^+ und Natrium im Inkubationsmedium vorhanden waren.

Die Na-K-ATPase Aktivität in Sammelrohrsegmenten von Kaninchen mit einem Körpergewicht von 0,7 kg bis 1,2 kg betrug $15,56 \pm 5,45$ pmol/min/mm und war damit etwa 50% niedriger als die der Tiere mit mehr als 1,5 kg Körpergewicht. Es waren sowohl die Gesamt-ATPase Aktivität mit $32,76 \pm 4,95$ pmol/min/mm als auch die Mg-ATPase Aktivität mit $17,20 \pm 2,50$ pmol/min/mm deutlich niedriger als die entsprechenden Werte der anderen Gruppe. Der Anteil der Na-K-ATPase an der Gesamt-ATPase betrug hier 45%.

3.5 Die Aktivität der Na-K-ATPase in gezüchteten Epithelien des Sammelrohres

3.5.1 Abhängigkeit der Aktivität der Na-K-ATPase von der Zellzahl

In den vier Versuchsserien an gezüchteten Sammelrohrepithelien zeigte sich eine Abhängigkeit zwischen Zellzahl pro Gewebekulturschale und der Gesamt- bzw. der Mg-ATPase.

In allen Versuchsserien war die Beziehung zwischen diesen Größen gleichartig und somit unabhängig von der Zusammensetzung des Nährmediums. Abbildung 16 illustriert diese Beziehung an einem Beispiel.

Bei Zellzahlen von 500 bis 2500 Zellen pro Kulturschale nahm die Enzymaktivität von Werten bis zu 120 fmol/min/Zelle bei der Gesamt-ATPase und bis zu 55 fmol/min/Zelle bei der Mg-ATPase auf Plateauwerte für beide Aktivitäten ab. Beide Plateauwerte erstreckten sich auf einen Zellzahlbereich von 2500 bis 30000 Zellen pro Kultur. Dieser konstan-

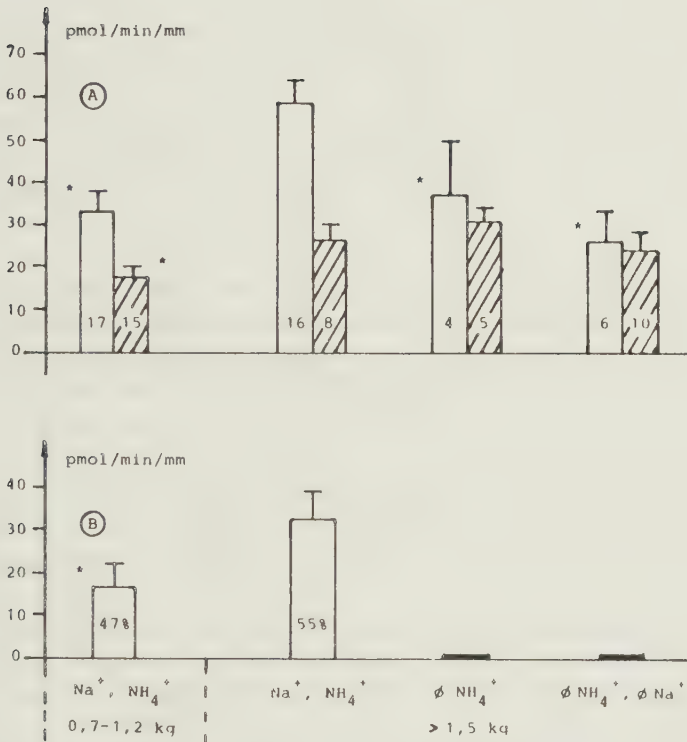


Abb. 15: Aktivität der Na-K-ATPase im kortikalen Sammelrohr von Kaninchen, wobei die Spezifität der Messung durch Entzug der Substrate zusätzlich untersucht wurde. * = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zum Versuch der Gruppe mit Na^+ und NH_4^+ und mehr als 1,5 kg Körpergewicht. Alle Werte ± 2 SEM.

A: Gesamt-ATPase (offene Säulen) und Mg-ATPase (schraffierte Säulen) mit der Anzahl der gemessenen Tubuli.

B: Na-K-ATPase Aktivität der entsprechenden Versuche mit ihrem Anteil an der Gesamt-ATPase.

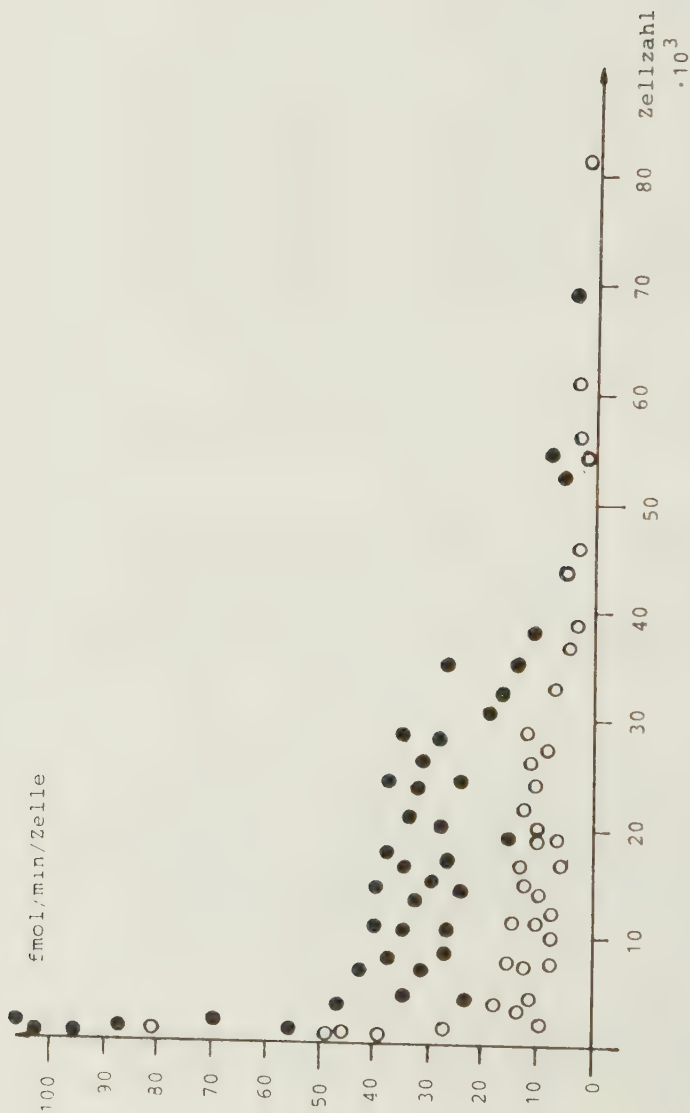


Abb. 16: Abhängigkeit der Aktivität der Na-K-ATPase von der Zellzahl pro Kultur in gezüchteten Sammelrohr epithelien bei mehr als zweitägigem Hormonentzug nach sechstägiger Anzüchtung mit Dexamethason 10^{-8} M und Triiodthyronin $3 \cdot 10^{-11}$ M.
 ● : Gesamt-ATPase; ○ : Mg-ATPase.

te Bereich wurde für die Berechnung der Enzymaktivitäten benutzt. In Kulturen mit Zellzahlen von mehr als 30000 Zellen nahmen die Aktivitäten der Gesamt- und Mg-ATPase ab.

3.5.2 Die Aktivität der Na-K-ATPase in gezüchteten Sammelrohrzellen bei unveränderter Zusammensetzung des Nährmediums

Die Zusammensetzung des Mediums war während der gesamten Züchtungszeit der Sammelroherepithelien unverändert.

Die Aktivität der Na-K-ATPase lag in einem Bereich von $18,96 \pm 4,54$ fmol/min/Zelle (Nährmedium und Aldosteron 10^{-6} M) bis $25,56 \pm 3,23$ fmol/min/Zelle (Nährmedium und Triiodthyronin $3 \cdot 10^{-11}$ M).

Die dazugehörigen Aktivitäten der Gesamt-ATPase betrugen $33,11 \pm 2,98$ bzw. $42,12 \pm 2,81$ fmol/min/Zelle und die der Mg-ATPase Aktivitäten $14,14 \pm 3,43$ bzw. $16,55 \pm 1,59$ fmol/min/Zelle (Abb. 17).

Die aus diesen Werten errechneten Aktivitäten der Na-K-ATPase unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander. Der Anteil der Na-K-ATPase an der Gesamt-ATPase betrug zwischen 55% und 63%.

Wurden die Sammelrohrzellen jedoch ohne Zugabe eines Hormones gezüchtet, so fand sich eine erniedrigte Aktivität des Enzymes. Aus einer Gesamt-ATPase von $22,90 \pm 2,18$ fmol/min/Zelle und einer Mg-ATPase von $11,47 \pm 2,17$ fmol/min/Zelle, die sich nicht signifikant von der Mg-ATPase Aktivität bei Hormonzusatz unterschied, errechnete sich eine Na-K-ATPase von $11,42 \pm 3,07$ fmol/min/Zelle, entsprechend 50% der Gesamt-ATPase.

3.5.3 Einfluß der Änderung des Nährmediums auf die Aktivität der Na-K-ATPase

In dieser Versuchsserie (II) wurde zunächst ein Nährmedium mit Dexamethason 10^{-8} M und Triiodthyronin $3 \cdot 10^{-11}$ M für

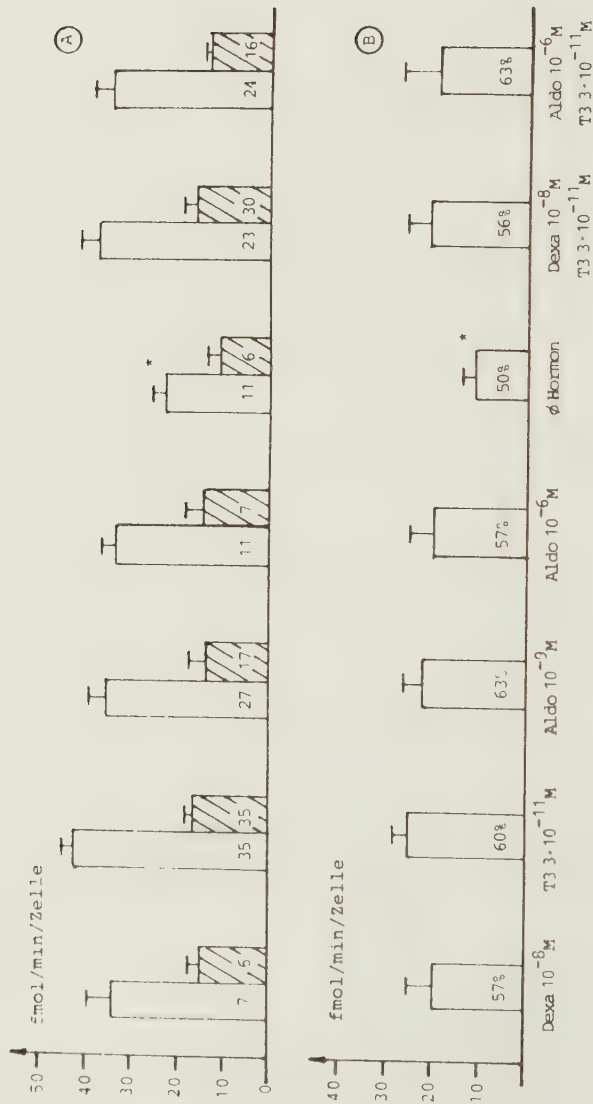


Abb. 17: Aktivität der Na-K-ATPase in gezüchteten Sammelrohrreithelien bei unveränderter Zusammensetzung des Nährmediums während der sechs- bis neuntägigen Anzüchtungszeit. * = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Alle Werte $\pm$ 2 SEM.

A: Gesamt-ATPase (offene Säulen) und Mg-ATPase (schraffierte Säulen); n = Zahl der Kulturen.

B: Na-K-ATPase Aktivität der entsprechenden Versuche mit dem Anteil an der Gesamt-ATPase.

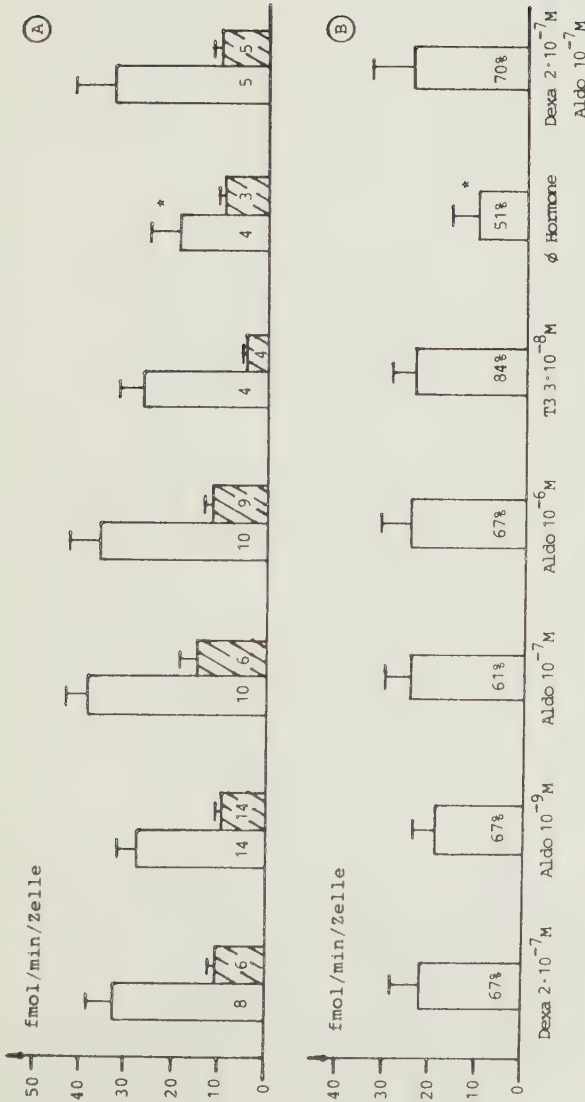


Abb. 18: Aktivität der Na-K-ATPase in gezüchteten Sammelrothepithelien, die nach sechstägiger Anzucht mit Dexamethason $10^{-8} M$ und T3 $3 \cdot 10^{-11} M$ für weitere drei Tage mit verändertem Hormonzusatz im Nährmedium versehen wurden. * = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zum Ausgangswert nach sechstägiger Anzucht. Alle Werte ± 2 SEM.

A: Gesamt-ATPase (offene Säulen) und Na-ATPase (schraffierte Säulen); n = Zahl der Kulturen.

B: Na-K-ATPase Aktivität der entsprechenden Versuche mit dem Anteil an der Gesamt-ATPase.

sechs Tage zugegeben. Die Aktivität der Na-K-ATPase betrug entsprechend Versuchsserie I $20,50 \pm 4,47$ fmol/min/Zelle (Kontrollwert). Während drei weiterer Tage wurde das Nährmedium mit einem anderen Hormonzusatz bzw. ohne Hormonzusatz verwendet.

Bei Inkubation im Nährmedium ohne Hormone wurde die Aktivität der Na-K-ATPase um über 50% auf $9,43 \pm 6,32$ fmol/min/Zelle erniedrigt. Die Gesamt-ATPase betrug $18,42 \pm 6,22$ fmol/min/Zelle und die Mg-ATPase $8,99 \pm 1,13$ fmol/min/Zelle (Abb. 18).

Die Aktivitäten der Na-K-ATPase nach dreitägiger Inkubation mit den verschiedenen Hormonen oder deren Kombinationen ergaben Werte von $18,40 \pm 4,41$ bis $23,58 \pm 4,80$ fmol/min/Zelle, die sich alle von der Kontrollaktivität nicht signifikant unterschieden. Der Anteil der Na-K-ATPase an der Gesamt-ATPase betrug immer über 60%.

Abbildung 18 zeigt weiterhin, daß die Aktivitäten der Mg-ATPase mit Werten von $8,99 \pm 1,13$ bis $14,86 \pm 3,12$ fmol/min/Zelle, außer bei Zusatz von Triiodthyronin von $3 \cdot 10^{-8}$ M mit $4,10 \pm 0,76$ fmol/min/Zelle, in allen Versuchen der Versuchsserie II sich weder untereinander noch gegenüber der Mg-ATPase Aktivität nach sechstägiger Vorzüchtung signifikant unterschieden.

3.5.4 Änderung der Aktivität der Na-K-ATPase während der Inkubation der gezüchteten Zellen im Nährmedium ohne Hormonzusatz

Die Zellkulturen der Sammelrohrephithelien wurden zunächst wie unter 3.5.3 beschrieben sechs Tage im Nährmedium mit Dexamethason 10^{-8} M und Triiodthyronin $3 \cdot 10^{-11}$ M inkubiert und danach bis zu fünf Tage im Nährmedium ohne Hormonzusatz weitergezüchtet.

Die Aktivität der Na-K-ATPase nach der sechstägigen Inkubation betrug $27,43 \pm 6,28$ fmol/min/Zelle. Nach Hormonentzug veränderte sich die Na-K-ATPase Aktivität innerhalb von

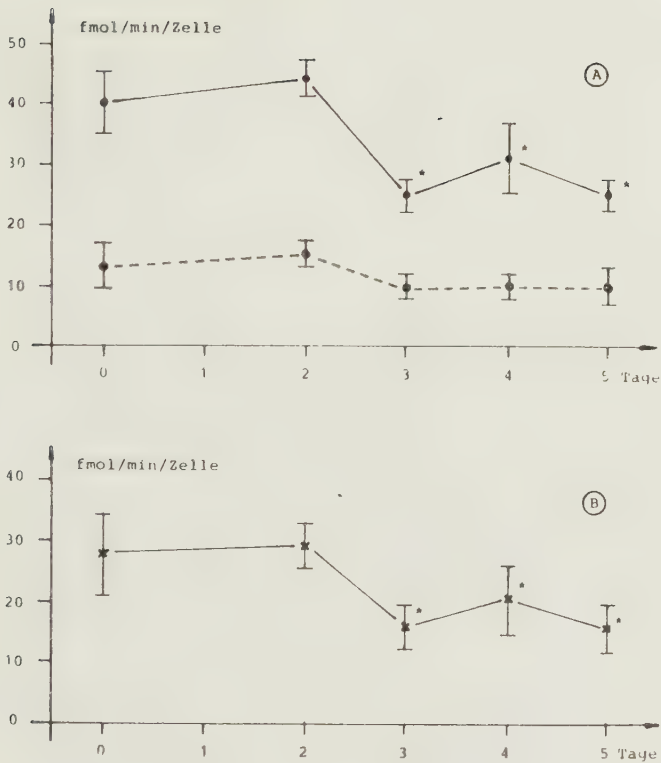


Abb. 19: Zeitlicher Verlauf der Na-K-ATPase Aktivität gezüchteter Sammelroherepithelien nach Hormondepletion des Nährmediums. * = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zum Kontrollwert mit Dexamethason 10^{-8} M und T3 $3 \cdot 10^{-11}$ M. Alle Werte ± 2 SEM.

A: (●) = Gesamt-ATPase; (○) = Mg-ATPase.

B: (x) = Na-K-ATPase.

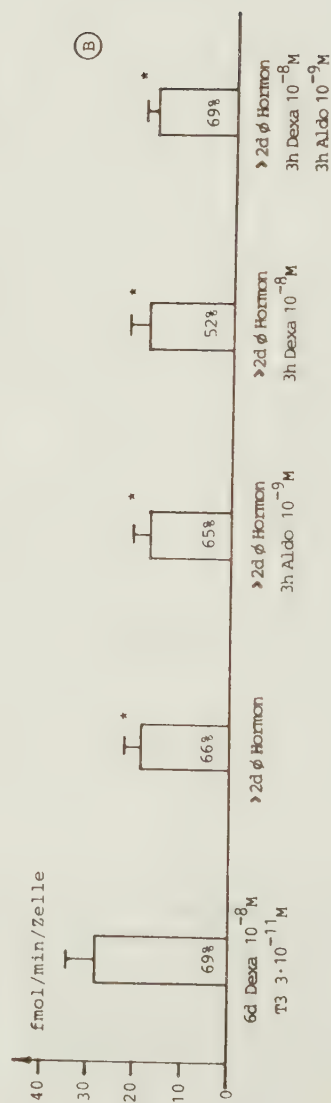
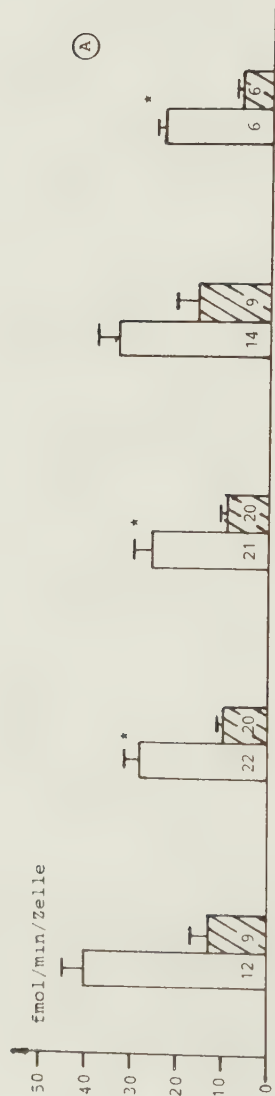


Abb. 20: Aktivität der Na-K-ATPase in gezüchteten Sammelrohrenepithelien, die nach mehr als zweitägiger "in vitro Adrenalektomie" für drei Stunden mit Aldosteron und/oder Dexamethason induziert wurden. * = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zum Ausgangswert vor der "in vitro Adrenalektomie". Alle Werte ± 2 SEM.

A: Gesamt-ATPase (offene Säulen), Mg-ATPase (schraffierte Säulen); n = Zahl der Kulturen.

B: Na-K-ATPase Aktivität der entsprechenden Versuche mit dem Anteil an der Gesamt-ATPase.

zwei Tagen zunächst nicht und behielt einen Wert von $29,13 \pm 3,60$ fmol/min/Zelle bei.

Dagegen war am dritten Tag der Inkubation im Nährmedium ohne Hormonzusatz die Aktivität auf $15,12 \pm 3,20$ fmol/min/Zelle erniedrigt (Abb. 19) und blieb auf diesem Wert während der fünftägigen Meßphase.

Die Mg-ATPase zeigte während der Inkubation ohne Hormonzusatz im Nährmedium keine signifikante Änderung gegenüber ihrer Aktivität vor dem Hormonentzug.

3.5.5 Einfluß einer dreistündigen Hormonzugabe nach mehr als zweitägiger Hormonverarmung des Nährmediums

Nachdem die Kulturen wie unter 3.5.3 angezüchtet worden waren, wurden sie mindestens drei Tage im Nährmedium ohne Hormonzusatz weitergezüchtet. Am Meßtag wurde für drei Stunden in hormonhaltigem Medium inkubiert.

Die Na-K-ATPase Aktivität war bei Substitution von Aldosteron (10^{-9} M) $16,87 \pm 3,10$ fmol/min/Zelle, für Dexamethason (10^{-8} M) $16,96 \pm 4,46$ fmol/min/Zelle und für Dexamethason (10^{-8} M) mit Aldosteron (10^{-9} M) $15,97 \pm 2,04$ fmol/min/Zelle (Abb. 20).

Die Aktivitäten der Gesamt- und Mg-ATPase dieser dreistündigen Inkubation betrugen für das Aldosteron $25,86 \pm 3,01$ bzw. $8,99 \pm 0,78$ fmol/min/Zelle und für die Inkubation in Aldosteron mit Dexamethason $23,16 \pm 1,80$ bzw. $7,19 \pm 0,96$ fmol/min/Zelle.

Bei der Inkubation mit Dexamethason alleine war trotz gleicher Na-K-ATPase Aktivität wie in den beiden anderen Versuchen die Gesamt-ATPase und die Mg-ATPase Aktivität mit $32,92 \pm 3,92$ bzw. $15,96 \pm 2,12$ fmol/min/Zelle signifikant höher als die entsprechenden Werte der beiden anderen Versuche.

Die Aktivität der Na-K-ATPase war in den drei Versuchen der Kurzzeitinduktion bezogen auf die Aktivität nach drei- bis fünftägiger Hormonverarmung nicht signifikant verändert.

4. Diskussion

4.1 Zur Methodik

4.1.1 Messung der Radioaktivität

Das bei der Hydrolyse des ATP durch die ATPasen entstehende anorganische Orthophosphat wurde direkt bestimmt.

Dem im Inkubationsmedium vorhandenen ATP wurde radioaktiv markiertes γ - ^{32}P -ATP in einer tausendfach niedrigeren Konzentration zugesetzt. Die in dem zu untersuchenden Gewebe enthaltenen ATPasen spalten während der Inkubation ATP in ADP und Orthophosphat. Der Tracer γ - ^{32}P -ATP verhält sich chemisch genauso wie das nicht markierte ATP, sodaß bei dessen Hydrolyse radioaktives ^{32}P -Orthophosphat abgespalten wurde.

Die Radioaktivität des abgespaltenen Orthophosphates wurde gemessen, nachdem es mit Ammoniummolybdat ausgefällt worden war. Es bildete sich dabei ein gelblich-grüner Niederschlag aus Molybdänphosphat. Die Fällungsreaktion für das Orthophosphat erfolgt quantitativ, d.h. das in Lösung vorliegende Orthophosphat wurde vollständig (mehr als 99,99%) in Molybdänphosphat umgewandelt (77).

Die Reaktion ist zudem noch hochspezifisch für Orthophosphat, da andere Stoffe, wie Pyrophosphat und weitere organische Phosphatester nicht mit Ammoniummolybdat reagieren. Weiterhin wird die Fällungsreaktion weder durch organisches Gewebe, noch durch die im Reaktionsgemisch vorhandenen Ionen beeinflusst (77, 79).

Das Verhältnis von Ammoniummolybdat und Orthophosphat muß größer als 2:1 sein, um das in der Lösung vorliegende Phosphat auszufällen.

Da das abgespaltene Orthophosphat in den Proben immer weniger als 20 nmol (20 μl Inkubationsmedium mit ATP 1 μM) be-

trug, war der daraus mit dem Ammoniummolybdat entstandene Niederschlag nicht sichtbar. Um einen gut sichtbaren Niederschlag zu erhalten, wurden zum Reaktionsstop zunächst 500 μ l Natriumphosphatlösung (Na_3PO_4 2mM; pH = 1,0; +4 °C) und danach 500 μ l Ammoniummolybdatlösung (16 mM) in das Reaktionsgefäß zugegeben.

In der Natriumphosphatlösung war 1 μ mol Orthophosphat enthalten, das ebenfalls vom Ammoniummolybdat ausgefällt wurde und somit einen gut sichtbaren gelb-grünen Niederschlag ergab. Zusätzlich blieben dadurch die Mengen des ausgefällten Niederschlages in allen Proben bis auf Schwankungen von $\pm 2\%$ konstant, da sich eine Änderung der Orthophosphatmenge nur durch eine Variation bei der Hydrolyse des ATP (höchstens 20 nmol) bemerkbar machen konnte.

Gleichzeitig wurde die ATP Spaltung auf drei Wege durch die zugesetzte Lösung 1 gestoppt. Alle Stoffe im Inkubationsmedium wurden auf das 51-fache verdünnt, die Inkubationstemperatur auf +4 °C herabgesetzt, und schließlich führte der pH-Wert von 1,0 zu einer Denaturierung der Gewebeiweiße. Die Konzentration von 16 mM Ammoniummolybdat in Lösung 2 gewährleistete mit dessen achtfachem Überschuß gegenüber einer Konzentration von 2 mM Natriumphosphat eine vollständige Fällung.

In Lösung 2 und 3 war zusätzlich noch Triethylamin enthalten, um als Bindemittel das schwer lösliche Molybdänphosphat zu größeren gelbgrünen Flocken zusammenzufügen. Dem Niederschlag wurde dadurch nach dem Zentrifugieren eine größere Stabilität verliehen, die für den nachfolgenden viermaligen Auswaschvorgang des Niederschlages benötigt wurde. Im gereinigten Niederschlag lag das gesamte Orthophosphat als Molybdänphosphat gebunden vor:

- abgespaltenes Orthophosphat
- abgespaltenes ^{32}P -Orthophosphat
- Orthophosphat aus Lösung 1.

Gemessen wurde das radioaktive Orthophosphat des Niederschlages im Beta-Zähler. Das Verhältnis der Radioaktivität von Standard zu Probe und die im Inkubationsmedium enthaltene Menge ATP ergab direkt die Menge des abgespaltenen Orthophosphates durch die ATPasen.

Eine Quenchkorrektur der so erhaltenen Meßwerte war, wie in 3.1.1 begründet, nicht notwendig.

4.1.2 Leerwerte

Ein weiteres Problem bei den Messungen trat auf, als bei den ersten Versuchen zur Bestimmung der Na-K-ATPase in Nephronsegmenten alle Leerwertbestimmungen mit Ouabain im Inkubationsmedium höhere Werte als die ohne Ouabain ergaben. Eine Konzentration von 2 mM Ouabain bewirkte eine linear mit der Zeit zunehmende Abspaltung von Orthophosphat. Der Korrelationskoeffizient der Beziehung betrug $r^2 = 0,99$ (s. 3.1.2).

Eine Erklärung für dieses Phänomen gibt es bislang noch nicht, jedoch wird diesem Umstand für die Bestimmung der Leerwerte Rechnung getragen.

Pro Versuch wurde aus drei Leerwerten mit und ohne Ouabain, die alle wie die am längsten zu inkubierende Probe mitinkubiert wurden, je ein Mittelwert gebildet.

Der Mittelwert ohne Ouabain konnte unabhängig von der Inkubationszeit für alle Proben der Gesamt-ATPase Messung verwendet werden (Abb. 12).

Für die Leerwerte bei der Mg-ATPase wurde eine Gerade in Abhängigkeit der Inkubationszeit erstellt, der für jede Probe entsprechend ihrer Inkubationszeit ein Leerwert entnommen werden konnte. Die Gerade wurde durch zwei Punkte definiert, der erste bei 0 Minuten mit dem Mittelwert ohne Ouabain und der zweite bei der längsten Inkubationszeit des Versuches mit dem Mittelwert mit Ouabain.

4.1.3 Thermoosmotischer Schock

Die ATP-Bindungsstelle der Na-K-ATPase liegt auf der Innenseite der Zellmembran. Das im Inkubationsmedium vorhandene ATP konnte nur hydrolysiert werden, wenn die Zellmembran soweit permeabel gemacht wurde, daß ein ausreichender Zugang für das ATP bestand. Dies konnte auf physikalischem oder chemischem Weg erreicht werden. In den hier beschriebenen Versuchen wurden nur physikalische Methoden, nämlich der hyposmotische und der thermische Schock angewendet. Zum hyposmotischen Schock wurden die Lösungen A (2 mosm) oder B (6 mosm) eingesetzt.

Die Osmolarität im Intrazellulärraum beträgt etwa 285 mosm. Die Zugabe von 10 µl hyposmotischer Lösung A oder B zum Gewebe führte aufgrund des osmotischen Gradienten zu einem hohen Wassereinstrom in die Zelle und dadurch zu einer beträchtlichen Volumenzunahme, wodurch die Zellmembran zerreißt. In den nun erhaltenen Zelltrümmern bestand die gleiche ionale Zusammensetzung, wie in Lösung A oder B. Im darauffolgenden thermischen Schock wurden die Proben auf -40 °C in Trockeneis eingefroren. Das intrazelluläre Wasser kristallisierte, wodurch ein weiteres Aufbrechen der Zellen bzw. der Zellbestandteile erreicht wurde.

Eine Permeabilisierung der Zellmembran mit chemischen Mitteln (Detergentien, EDTA oder Deoxycholat) wurde nicht versucht, weil diese Stoffe die Lipide herauslösen. Für die Na-K-ATPase könnte das bedeuten, daß durch Herauslösen funktionell bedeutsamer Lipide aus der Mikro-Umgebung deren Aktivität unspezifisch verändert wird (68).

4.1.4 Vergleich der Aktivität der Na-K-ATPase (γ -³²P-Nachweis) mit anderen Meßmethoden

Es wurde überprüft, ob die mit der beschriebenen Methode erhobenen Befunde mit den in der Literatur bekannten Daten

Übereinstimmen oder von ihnen verschieden sind. Dieser Vergleich war nur bei den Sammelrohrepithelien möglich, da Befunde zur Aktivität der Na-K-ATPase in gezüchteten Epithelzellen definierter Nephronsegmente nicht vorgelegen hatten. Außerdem wurde die Spezifität des Enzymnachweises untersucht.

Dazu wurden in drei Versuchsreihen an Sammelrohrsegmenten der Kaninchenniere (Körpergewicht $> 1,5$ kg) die Aktivität der Gesamt- und Mg-ATPase gemessen.

In Versuchsreihe 1 enthielt das Inkubationsmedium Natrium und NH_4^+ , in Versuchsreihe 2 fehlte NH_4^+ und in Versuchsreihe 3 fehlten Natrium und NH_4^+ . Das Ammoniumion wurde als Kaliumanalogon benutzt (28, 29).

Unter Bedingung 2 und 3 zeigten sich im Gegensatz zu 1 keine Differenz zwischen Gesamt- und Mg-ATPase. Das Fehlen der ouabainsensitiven Enzymaktivität bei Substratzug (Fehlen von Natrium und/oder NH_4^+) bedeutete den Nachweis der Spezifität der Enzymmessung.

Zusätzlich war die Mg-ATPase Aktivität in Versuchsreihe 1 genauso hoch wie die ATPase Aktivitäten mit und ohne Ouabain in den Versuchsreihen 2 und 3, was bedeutete, daß eine Konzentration von 2 mM Ouabain eine vollständige Hemmung der Na-K-ATPase vollziehen konnte.

Der dabei in Versuchsreihe 1 gemessene Wert der Enzymaktivität von $32,16 \pm 6,77$ pmol/min/mm lag im oberen Bereich der bis dahin veröffentlichten Daten (Tab. 4).

In einer vierten Versuchsreihe wurde dann die Na-K-ATPase Aktivität in den Sammelrohren von Kaninchen mit einem Körpergewicht von 0,7 - 1,2 kg bestimmt, die zur Züchtung von Sammelrohrepithelien verwendet wurden. Es ergab sich ein Wert von $15,56 \pm 5,45$ pmol/min/mm.

Um einen Vergleich der Aktivitäten der Tubuli mit denen der gezüchteten Epithelien erhalten zu können, mußte die Na-K-ATPase Aktivität der Tubuli pro Zelle ermittelt werden, da

Gesamt-ATPase	Mg-ATPase	Na-K-ATPase	Referenz
31,1	20,5	10,6	40
36,6	23,7	12,9	65
32,6	18,9	13,7	43
32,6	18,1	14,5	19
31,0	15,3	15,7	63
/	/	18,5	59
44,0	21,0	23,0	28
58,2	26,1	32,1	diese Studie

Tab. 4: Vergleich der bisher gemessenen Aktivitäten der Na-K-ATPase im kortikalen Sammelrohr von Kaninchen mit einem Körpergewicht von mehr als 1,5 kg.

Alle Werte sind in pmol/mm/min angegeben.

die Aktivität in den Kulturen pro Zelle berechnet wurde. Nahm man wie bei den Kaninchen mit einem Körpergewicht von mehr als 1,5 kg einen Wert von 511 Zellen/mm Tubuluslänge an (28), so ergab sich eine Aktivität von 30,45 fmol/min/Zelle.

4.2 Bedeutung der Größe der Zellmonolayer für die Enzymmes- sung

Die Aktivität der Na-K-ATPase pro Zelle ist abhängig von der Zellzahl der Kultur.

Es ergab sich ein Aktivitätsprofil der Gesamt- und Mg-ATPase in Abhängigkeit von der Zellzahl, das jedoch unabhängig von den Züchtungsbedingungen war (3.5.1).

In den Kulturen mit Zellzahlen unter 2500 Zellen fanden sich so hohe Unterschiede der Enzymaktivitäten, daß Werte aus diesem Bereich ausgeschlossen wurden.

Im Gegensatz hierzu ergab sich in allen Versuchen mit Zellzahlen zwischen 2500 und 30000 ein Plateau der Aktivitäten (Abb. 16), d.h. die Aktivität pro Zelle war unabhängig von der Größe ($\hat{=}$ Zellzahl) der Kultur. Daher ließ sich in diesem Bereich für die Gesamt-ATPase und für die Mg-ATPase Aktivität jeweils ein Mittelwert bilden, aus dem die Na-K-ATPase Aktivität als Differenz der beiden Werte errechnet wurde.

Bei höheren Zellzahlen nahm die Aktivität der Gesamt- und Mg-ATPase ab, sodaß sie für die Berechnung nicht mehr verwendet wurde.

Da es notwendig war die Enzymaktivitäten verschiedener Versuchsbedingungen zu vergleichen, wurde die Mittelwertsberechnung im Plateaubereich gegenüber einem Vergleich von Enzymaktivitätsfunktionen in Abhängigkeit der Zellzahl bevorzugt.

Es konnte in den hier vorgelegten Untersuchungen nicht gemessen werden, ob in Kulturen mit weniger als 2500 Zellen

jede einzelne Zelle mehr Na-K-ATPase Moleküle pro Fläche oder eine größere basolaterale Membranfläche besitzt, und bei Kulturen mit mehr als 30000 Zellen sich beide Größen gegensinnig verhalten. Diese Frage sollte durch Bindungsstudien und durch autoradiographischen Nachweis von ^3H -Ouabain sowie durch Messung der Größe der basolateralen Zellmembranfläche beantwortet werden können.

Andererseits läßt sich die verringerte Aktivität des Enzyms pro Zelle im Bereich von über 30000 Zellen pro Kultur im Zusammenhang mit dem Befund sehen, daß die Proteinmenge pro Zelle in gezüchteten Sammelrohrzellen im Bereich dieser hohen Zellzahlen abnimmt (76).

4.3 Hormonelle Beeinflussung der Aktivität der Na-K-ATPase in gezüchteten Sammelrohrzellen

Bei allen Versuchen mit gezüchteten Sammelrohrepithelien wurde die hormonelle Regulation der Na-K-ATPase durch Aldosteron, Dexamethason oder Triiodthyronin untersucht, da diese Hormone in vivo auf die Na-K-ATPase des Nephrons wirken.

Auch wurden die Versuche nach der Dauer der Hormonzufuhr in chronische (länger als drei Stunden in Versuchsserie I und II) und in akute (kürzer als drei Stunden in Versuchsserie IV) Versuche unterteilt.

Zusätzlich wurde der zeitliche Verlauf der Na-K-ATPase Aktivität bei chronischem Hormonentzug in gezüchteten Sammelrohrepithelien (Versuchsserie III) in Anlehnung an den chronischen Hormonentzug in vivo ($\approx$ Adrenalektomie) untersucht.

4.3.1 Chronische Hormonzufuhr bzw. Hormonentzug

Die in vitro gezüchteten Zellen proliferieren in einem künstlichen Medium. Ein Ausgangswert, wie z.B. die in vivo Aktivität der Na-K-ATPase im Sammelrohr bei normaler Diät des Tieres, ist nicht vorhanden. Deshalb wurden zuerst in

Versuchsserie I die Wirkungen der einzelnen Hormone oder Hormonkombinationen in physiologischen Konzentrationen während des Wachstums der Epithelien auf die Aktivität der Na-K-ATPase geprüft.

Wenn Aldosteron, Dexamethason und Triiodthyronin in physiologischen Konzentrationen allein dem Medium zugesetzt wurden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied der spezifischen Na-K-ATPase Aktivität pro Zelle. Das gleiche galt für die Kombination von Dexamethason und Triiodthyronin; eine spezifische Wirkung eines dieser Hormone auf die Na-K-ATPase Aktivität in gezüchteten Sammelrohr epithelien konnte nicht beobachtet werden.

Die Werte für die Na-K-ATPase Aktivitäten in den gezüchteten Epithelien waren jedoch mit $18,96 \pm 4,54$ bis $25,56 \pm 3,23$ fmol/min/Zelle alle niedriger als die unter 4.1.4 angenommene Aktivität der Tubuli mit 30,45 fmol/min/Zelle, die für die Züchtung der Epithelien verwendet worden waren. Dieser Aktivitätsverlust könnte mit einer Änderung der Stimulationsfähigkeit der Na-K-ATPase in den gezüchteten Epithelien gegenüber ihren Ausgangszellen einhergehen.

Eine tausendfach höhere Konzentration von Aldosteron (10^{-6} M) während der Zellproliferation (allein oder in Kombination mit Triiodthyronin $3 \cdot 10^{-11}$ M) zeigte ebenfalls keinen Unterschied zu den davor gemessenen Na-K-ATPase Aktivitäten. Im Gegensatz wurde dazu in vivo durch die chronisch erhöhte Gabe von Mineralocorticoiden eine Erhöhung der Na-K-ATPase Aktivität im kortikalen Sammelrohr gemessen (28, 61, 63, 64).

Jedoch ergab sich ein ähnliches Verhalten wie bei der Na-K-ATPase der Sammelrohrzellen in vivo, wenn den in vitro gezüchteten Epithelien diese drei Hormone im Nährmedium während der gesamten Wachstumsphase entzogen worden waren. Der Hormonentzug bewirkte eine Erniedrigung der Na-K-ATPase Aktivität pro Zelle um 50%, ähnlich wie die Adrenalektomie

beim Tier (18, 19, 40, 60, 66).

Es wurden also in der Versuchsserie I keine spezifischen Hormonwirkungen von Aldosteron, Dexamethason und Triiodthyronin durch Erhöhung der Konzentration im Medium oder durch Kombination der Hormone gefunden, wie sie in den Sammelrohrzellen in vivo als Aktivitätserhöhung der Na-K-ATPase nach chronischen Gaben von Aldosteron beobachtet wurden. Jedoch ergab sich ein gleichsinniges Verhalten der gezüchteten Sammelrohrepithelien mit den Sammelrohrzellen in vivo bei Hormonentzug.

Um genauere Aussagen der chronischen Wirkungen dieser Hormone auf die Na-K-ATPase Aktivität zu erhalten, wurde versucht, einen Kontrollwert der Na-K-ATPase Aktivität zu definieren, auf den dann die einzelnen Hormonwirkungen bezogen werden konnten. Dies wurde in Versuchsserie II durchgeführt.

Alle Kulturen wurden für sechs Tage, wie in 2.4.4 beschrieben, mit Dexamethason 10^{-8} M und Triiodthyronin $3 \cdot 10^{-11}$ M angezüchtet. Die Na-K-ATPase Aktivität der Zellen bei dieser Hormonkombination von $20,50 \pm 4,47$ fmol/min/Zelle wurde als Ausgangswert für die darauffolgende Veränderung der hormonellen Zusammensetzung des Nährmediums für drei Tage und deren Auswirkungen auf die Na-K-ATPase Aktivität festgelegt.

Es wurde kein Aldosteron in dieser Phase verwendet, da es in vivo die Sammelrohrzellen als Target hat und seine Wirkungen sowohl in physiologischen als auch pharmakologischen Konzentrationen in der anschließenden dreitägigen Induktionsphase entfalten sollte.

Die drei verwendeten Aldosteronkonzentrationen 10^{-9} M (physiologisch), 10^{-7} M und 10^{-6} M (pharmakologisch) ergaben jedoch keine signifikante Änderung der Na-K-ATPase Aktivität bezogen auf den Ausgangswert. Es zeigte sich wie bei der Versuchsserie I keine spezifische Wirkung des Aldosterons

auf die Na-K-ATPase an den gezüchteten Sammelrohrepiethelien bei chronischer Hormonzufuhr.

Ebenso wurden die in der Anzüchtungsphase dem Medium zugesetzten Hormone Dexamethason und Triiodthyronin in zwanzigfacher bzw. tausendfacher Konzentration dem Medium für die dreitägige Induktion jeweils allein zugesetzt. Auch hier zeigte sich keine Änderung der Na-K-ATPase Aktivität pro Zelle.

Das gleiche galt für die Induktion mit der Hormonkombination von Dexamethason $2 \cdot 10^{-7}$ M und Aldosteron 10^{-7} M.

Das Verhalten der Zellen nach der Gabe von Glucocorticoiden entsprach dem der Zellen in vivo (64).

Die Wirkung von Triiodthyronin an den gezüchteten Epithelien kann jedoch noch nicht gewertet werden, da an euthyreoten Tieren die Wirkung des Schilddrüsenhormones auf die Na-K-ATPase noch nicht untersucht wurde.

In der Versuchsserie II wurde dann auch wie in Versuchsserie I eine dreitägige Hormondepletion im Anschluß an die Anzüchtung durchgeführt. Dort zeigte sich eine Erniedrigung der Na-K-ATPase Aktivität um 50% des Ausgangswertes, ähnlich dem Verhalten der gezüchteten Epithelien in Versuchsserie I bei Hormonentzug.

Im Gegensatz zu Versuchsserie I lag hier durch die Züchtung mit der Dexamethason/Triiodthyronin-Kombination bei den später hormonverarmten Zellen eine höhere Ausgangsaktivität vor, sodaß in diesem Versuch eine Aktivitätserniedrigung in den Zellen nachweisbar war.

Dieses Verhalten der Na-K-ATPase in den gezüchteten Sammelrohrepiethelien entsprach dem des Enzymes in den Zellen des Sammelrohres in vivo nach Adrenalektomie, d.h. es handelte sich um ein "in vitro Adrenalektomie-Verhalten" durch Hormonverarmung des Nährmediums.

Der zeitliche Verlauf der Na-K-ATPase Aktivität bei Hormon-

entzug wurde in Versuchsserie III über fünf Tage hinweg untersucht. Die Erniedrigung der Na-K-ATPase auf 50% des Kontrollwertes war nach mehr als zwei Tagen erreicht und blieb dann bis zum fünften Tag auf diesem Niveau. Die Aktivität der Mg-ATPase änderte sich während der gesamten Zeit der Hormonverarmung nicht signifikant.

Ein ähnliches Verhalten der Enzymaktivität zeigte sich bei der in vivo Adrenalektomie, wobei dieser Status bei ausreichender Kochsalzzufuhr vom Organismus bis zu drei Wochen toleriert wurde (60). Damit bestand nun auch bei den gezüchteten Sammelroherepithelien nach "in vitro Adrenalektomie" die Möglichkeit durch erneute Hormongaben deren Wirkungen auf die Na-K-ATPase zu untersuchen.

Hier waren jedoch nach vier- bis fünftägigem Hormonentzug, was einer Gesamtzüchtungszeit von zehn bzw. elf Tagen entsprach, nur noch wenige Kulturen mit einer Zellzahl von weniger als 30000 Zellen zu erhalten, mit denen eine nach den Erläuterungen aus 4.2 sinnvolle Enzymaktivitätsbestimmung durchzuführen gewesen wäre.

Somit blieben für weitere Hormoninduktionen von gezüchteten Sammelroherepithelien nach Hormonentzug maximal 1,5 Tage Zeit, da die gesamte Anzüchtungszeit der Kulturen für eine wirksame "in vitro Adrenalektomie" mindestens neun Tage benötigte. Deshalb wurde in Versuchsserie IV die dreistündige Kurzzeitinduktion nach Hormonentzug untersucht.

4.3.2 Akute Hormonwirkungen der NNR-Steroide nach chemischer "in vitro Adrenalektomie"

Wie in 2.4.4 beschrieben, wurde den gezüchteten Sammelroherepithelien nach mindestens dreitägiger Hormondepletion Aldosteron und/oder Dexamethason in physiologischen Konzentrationen für drei Stunden im Nährmedium zugesetzt.

Weder Aldosteron noch Dexamethason oder die Kombination beider Hormone zeigten eine Erhöhung der Aktivität der Na-K-ATPase, wie sie in vivo (18, 19) und in vitro (40) beobach-

tet wurde.

Jedoch geht dieser Befund mit anderen Beobachtungen am kortikalen Sammelrohr in vivo, die innerhalb von drei Stunden keinerlei Effekt von Aldosteron oder Dexamethason nach Adrenalektomie gemessen hatten, einher (14, 61).

Auf ein abweichendes Verhalten der gezüchteten Sammelroherepithelien gegenüber den Sammelrohrzellen in vivo kann deshalb noch nicht geschlossen werden.

Es müßten jedoch an Zellkulturen Versuche zum Verhalten des Natriumeinstromes und des elektrischen Widerstandes der apikalen Zellmembran unter akuter Aldosteronwirkung nach "in vitro Adrenalektomie" durchgeführt werden, um für die Akutphase des Aldosterons auf ein gleich- oder gegensinniges Verhalten zu den Sammelrohrzellen in vivo schließen zu können.

Ähnliches gilt für die Wirkung von Spironolakton bei Aldosterongaben. Diese Versuche wurden hier bei der Kurzzeitinjektion nicht durchgeführt, da sich kein Effekt der Hormone gezeigt hatte, der durch Spironolakton hätte gehemmt werden können.

Eine weitere Möglichkeit das Verhalten der gezüchteten Epithelien mit den in vivo gewachsenen Sammelrohrzellen vergleichen zu können, wäre die chronische Gabe von Aldosteron und Dexamethason nach "in vitro Adrenalektomie".

Bei den in vivo Versuchen wurden die Hormone den adrenaletomierten Tieren jedoch mindestens zwei Tage verabreicht, sodaß eine entsprechende Züchtungszeit der Zellkulturen mindestens elf Tage betragen würde. Die Ausbeute an Zellkulturen mit weniger als 30000 Zellen wäre dann relativ gering, was die Gewinnung von Daten unter den hier angewendeten Kautelen sehr erschweren würde.

5. Zusammenfassung

Das Epithel des kortikalen Sammelrohres der Niere ist wesentlich beteiligt an der Regulation der extrazellulären Natrium- und Kaliumhomöostase. Es steht dabei unter der Kontrolle von Corticosteroiden und anderen Hormonen.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob die hormonelle Abhängigkeit dieser Epithelfunktion auch in gezüchteten Zellen zum Ausdruck kommt; als Meßparameter diente dabei der quantitative Nachweis der Aktivität der Na-K-ATPase, das biochemische Äquivalent des membranständigen Ionencarriers der basolateralen Zellmembran.

Die Enzymaktivität wurde radiochemisch durch das aus γ - ^{32}P -ATP von den gezüchteten Zellen abgespaltene ^{32}P -Orthophosphat nachgewiesen.

Wenn dem Nährmedium die Hormone Aldosteron, Dexamethason und Triiodthyronin in physiologischen Konzentrationen zugesetzt wurden, so ergaben sich Enzymaktivitäten zwischen $18,96 \pm 4,54$ und $25,56 \pm 3,23$ fmol/min/Zelle. Dieser Wert entspricht etwa der Enzymaktivität der in vivo gewachsenen Zellen des kortikalen Sammelrohres.

Wurden diese Hormone über einen Zeitraum von sechs Tagen dem Medium entzogen, so erniedrigte sich die Enzymaktivität um etwa 50% auf $11,47 \pm 3,07$ fmol/min/Zelle.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Zellen während sechs Tagen in Gegenwart von Dexamethason und Triiodthyronin gezüchtet; die Enzymaktivität betrug danach $20,50 \pm 4,47$ fmol/min/Zelle; der Zusatz von Aldosteron in das Medium ergab keine weitere Erhöhung dieser Aktivität. Wurden jedoch nunmehr diese Hormone dem Medium entzogen, so fiel nach drei Tagen die Enzymaktivität um etwa 50% auf den Wert von $9,43 \pm 6,32$ fmol/min/Zelle.

In dieser Situation der "in vitro Adrenalektomie" wurde weder durch Aldosteron noch durch Dexamethason akut, d.h. innerhalb von weniger als drei Stunden, eine Erhöhung der En-

zymaktivität induziert.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde zeigen somit, daß die Aktivität des Ionencarriers Na-K-ATPase auch in einem neuentwickelten in vitro Zellsystem des kortikalen Sammelrohres abhängig ist von den Hormonen, die in vivo das Enzym regulieren.

Die Untersuchungen eröffnen die Möglichkeit, chronische Wirkungen der regulierenden Hormone auf die Enzymaktivität nunmehr für jedes Hormon einzeln zu definieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Barlet C., Ben Abdelkhalet M., Doucet A.
Sites of thyroid hormone action on Na-K-ATPase along
the rabbit nephron
Pflügers Arch. 405: 52-57, 1985
2. Beauwens R., Crabbe J.
Evidence for concerted effects of aldosterone on a tar-
get sodium-transporting epithelium
J. Clin. Invest. 72: 928-934, 1983
3. Beck J.C., Sacktor B.
Energetics of the Na^+ -dependent transport of D-Glucose
in renal brush border membrane vesicles
J. Biol. Chem. 250: 8674-8680, 1975
4. Benjamin W.B., Singer I.
Aldosterone-induced protein in toad urinary bladder
Science 186: 269-272, 1974
5. Bia M., Tyler K., DeFronzo K.
Kaliuretic effect of dexamethasone - a property unrela-
ted to mineralocorticoid activity (abstract)
Kidney Int. 21: 258, 1982
6. Boardman L.J., Lamb J.F., McCall D.
Uptake of (3H)Ouabain and Na pump turnover rates in
cells cultured in ouabain
J. Physiol. 225: 619-635, 1972
7. Campen T.J., Vaughn D.A., Fanestil D.D.
Mineralo- and glucocorticoid effects on renal excretion
of electrolytes
Pflügers Arch. 399: 93-101, 1983

8. Cantley L.C., Gelles J., Josephson L.
Reaction of the (Na-K)ATPase with 7-Chloro-4-nitro-benzo-
2-oxa-1,3-diazole: Evidence for an essential Tyrosin at
the active site
Biochem 17: 418-425, 1978
9. Csaky T.Z., Hartig H.G. III., Fenald G.W.
Effects of digitalis on activ intestinal sugar trans-
port
Am. J. Physiol. 200: 459-460, 1961
10. Csaky T.Z., Thale M.
Effect of ionic environment on the intestinal sugar
transport
J. Physiol 151: 59-65, 1960
11. Deetjen P.
Nierenphysiologie
In: Gauer, Kramer, Jung, Physiologie des Menschen Bd. 7:
Boylan J.W., Deetjen P., Kramer K.
Niere und Wasserhaushalt
Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien 1970
12. Degani Ch., Boyer P.D.
A borohydride reduction method for characterisation of
the alcyyl phosphate linkage in proteins and its applica-
tion to sarcoplasmatic reticulum adenosine triphospha-
tase
J. Biol. Chem. 248: 8222-8226, 1973
13. Doucet A., Katz A.I.
Renal potassium adaptation. Na-K-ATPase activity along
the nephron after chronic potassium adaptation
Am. J. Physiol. 238: F380-F386, 1980

14. Doucet A., Katz A.I.
Short-term effect of aldosterone on Na-K-ATPase in single nephron segments
Am. J. Physiol. 241: F273-F278, 1981
15. Doucet A., Katz A.I.
Mineralocorticoid receptors along the nephron: (3H)aldosterone binding in rabbit tubules
Am. J. Physiol. 241: F605-F611, 1981
16. Doucet A., Katz A.I., Morel F.
Determination of the Na-K-ATPase activity in single segments of the mammalian nephron
Am. J. Physiol. 273: F105-F113, 1979
17. Dou Hue J., Albers R.W., Koval G.J.
Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase of Electrophorus electric eel organ: X. Immunochemical properties of lubrol-solubilized enzyme and its constituent polypeptides
J. Biol. Chem. 250: 1035-1040, 1975
18. El Mernissi G., Doucet A.
Short-term effect of aldosterone on renal sodium transport and tubular Na-K-ATPase in the rat
Pflügers Arch. 399: 139-146, 1983
19. El Mernissi G., Doucet A.
Short-term effect of aldosterone and dexamethasone on Na-K-ATPase along the rabbit nephron
Pflügers Arch. 399: 147-151, 1983
20. El Mernissi G., Doucet A.
Specific activity of Na-K-ATPase after adrenalectomy and hormone replacement along the rabbit nephron
Pflügers Arch. 402: 258-263, 1984

21. Fanestil D.D., Park C.S.
Steroid hormones and the kidney (review)
Ann. Rev. Physiol. 43: 637-649, 1981

22. Farman N., Vandewalle A., Bonvalet J.P.
Binding of aldosterone to cytoplasmatic and nuclear receptors of the rabbit kidney
Am. J. Physiol. 240: C20-C27, 1981

23. Farman N., Vandewalle A., Bonvalet J.P.
Aldosterone binding in isolated tubules: I. Biochemical determination in proximal and distal parts of the rabbit nephron
Am. J. Physiol. 242: F63-F68, 1982

24. Farman N., Vandewalle A., Bonvalet J.P.
Aldosterone binding in isolated tubules: II. An autoradiographic study of concentration dependency in the rabbit nephron
Am. J. Physiol. 242: F69-F77, 1982

25. Farman N., Vandewalle A., Bonvalet J.P.
Autoradiographic determination of dexamethasone binding-sites along the rabbit nephron
Am. J. Physiol. 244: F325-F334, 1983

26. Flashner M.S., Robinson J.D.
Effects of Mg^{2+} on activation of the $(Na^{+}+K^{+})$ -dependent ATPase by Na^{+}
Arch. Biochem. Biophys. 192: 584-591, 1979

27. Froelich J.P., Albers R.W., Koval G.J., Goebel R., Berman M.
Evidence for a new intermediate state in the mechanism of $(Na^{+}+K^{+})$ -adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem. 251: 2186-2188, 1976

28. Garg L.C., Knepper M.A., Burg M.B.
Mineralocorticoid effects on Na-K-ATPase in individual
nephron segments
Am. J. Physiol. 240: F536-F544, 1981

29. Garg L.C., Mackie S., Tisher C.C.
Effect of low potassium-diet on Na-K-ATPase in rat ne-
phron segments
Pflügers Arch. 394: 113-117, 1982

30. Garg L.C., Navang N., Wingo Ch. S.
Glucocorticoid effects on Na-K-ATPase in rabbit nephron
segments
Am. J. Physiol. 248: F487-F491, 1985

31. Garrahan P.J., Glynn I.M.
The behaviour of the sodium pump in red cells in the ab-
sence of external potassium
J. Physiol. 192: 159-174, 1967

32. Garty H., Edelman I.S., Lindemann B.
Metabolic regulation of apical sodium permeability to
toad urinary bladder in the presence and absence of
aldosterone
J. Membr. Biol. 74: 15-24, 1983

33. Geering K., Girardet M., Bron C., Kraehenbühl J-P.,
Rossier B.C.
Hormonal regulation of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase biosynthesis
in the toad bladder
J. Biol. Chem. 257: 10338-10343, 1982

34. Giotta G.J.
Quaternary structure of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -dependent adenosine
triphosphatase
J. Biol. Chem. 251: 1247-1252, 1976

35. Handler J.S., Perkins F.M., Johnson J.P.
Hormone effects on transport in cultured epithelia with high electrical resistance
Am. J. Physiol. 240: C103-C105, 1981
36. Hart W.M., Titus E.O.
Sulphydryl groups of sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. Protection by physiological ligands and exposure by phosphorylation
J. Biol. Chem. 248: 4674-4681, 1973
37. Hastings D.F., Reynolds J.A.
Molecular weight of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ shark rectal gland
Biochem. 18: 817-821, 1979
38. Hegyvary C., Post R.L.
Binding of adenosine triphosphatase to sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem. 246: 5234-5240, 1971
39. Horster M.
Primary culture of mammalian nephron epithelia
Pflügers Arch. 382: 209-215, 1979
40. Horster M., Schmid H., Schmidt U.
Aldosterone in vitro restores nephron Na-K-ATPase of distal segments from adrenalectomized rabbits
Pflügers Arch. 384: 203-206, 1980
41. Horster M.F., Stopp M.
Transport and metabolic functions in cultured renal tubule cells
Kidney Int. 29: 46-53, 1986

42. Joergensen P.L.
Purification and characterisation of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase.
III. Purification from the outer medulla of mammalian
kidney after selective removal of membran components
by sodiumdodecyl sulphate
Biochem. Biophys. Acta 356: 36-52, 1974
43. Kaplan J.H.
Sodium ions and the sodium pump: transport and enzyma-
tic activity (review)
Am. J. Physiol. 245: G327-G333, 1983
44. Katz A.I., Doucet A., Morell F.
Na-K-ATPase activity along the rabbit, rat and mouse
nephron
Am. J. Physiol. 237: F114-F120, 1979
45. Kyte J.
Purification of the sodium- and potassium-dependent
adenosine triphosphatase from the canine renal medulla
J. Biol. Chem. 246: 4157-4165, 1971
46. Kyte J.
Properties of the two polypeptides of sodium- and po-
tassium-dependent adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem. 247: 7642-7649, 1972
47. Kyte J.
Structural studies of sodium and potassium ion-activa-
ted adenosine triphosphatase. The relationship between
molecular structure and the mechanism of active trans-
port
J. Biol. Chem. 250: 7443-7449, 1975

48. Law P.Y., Edelman I.S.
Induction of citrat synthetase by aldosterone in the
rat kidney
J. Membr. Biol. 41: 41-64, 1978
49. Lee J.B., Crowshaw K., Takman B.H., Attrep K.A., Gou-
goutas J.Z.
The identification of prostaglandines E_2 , $F_{2\alpha}$ and A_2
from rabbit kidney medulla
Biochem. J. 105: 1251-1260, 1967
50. Lo C-S., August T.R., Liberman U.A., Edelman I.S.
Dependence of renal $(Na^+ + K^+)$ -adenosine triphosphatase
activity on thyroid status
J. Biol. Chem. 251: 7826-7833, 1976
51. Lo C-S., Cheng W., Klein L.E.
Effect of triiodothyronine on $(Na^+ + K^+)$ -adenosine tri-
phosphatase and $(Na^+ + Mg^{2+})$ -dependent phosphorylated in-
termediate in rat salivary glands
Pflügers Arch. 392: 134-138, 1981
52. Lo C-S., Edelman I.S.
Effect of triiodothyronine on the synthesis and degrada-
tion of renal cortical $(Na^+ + K^+)$ -adenosine triphospha-
tase
J. Biol. Chem. 251: 7834-7840, 1976
53. Lo C-S., Lo T.N.
Time course of the renal response to triiodothyronine in
the rat
Am. J. Physiol. 236: F9-F13, 1979

54. Lo C-S., Lo T.N.
Effect of triiodothyronine on the synthesis and degradation of the small subunit of renal cortical ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem. 255: 2131-2136, 1980
55. Lo T.N., Titus E.O.
Effects of ligands on conformationally dependent tryptophan hydroxylase of (sodium plus potassium)-activated adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem. 253: 4432-4438, 1978
56. Marver D., Schwartz M.J.
Identification of mineralocorticoid target sites in isolated rabbit cortical nephron
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77: 3672-3676, 1980
57. Mills J.W., Macknight A.D.C., Dayer J-M., Ausiello D.A.
Localisation of (3H)ouabain-sensitive Na^+ -pump sites in cultured pig kidney cells
Am. J. Physiol. 236: C157-C162, 1979
58. Mishina T., Scholer D.W., Edelman I.S.
Glucocorticoid receptors in rat kidney cortical tubules enriched in proximal and distal segments
Am. J. Physiol. 240: F38-F45, 1981
59. Mohraz M., Smith P.R.
Structure of (Na^+ , K^+)-ATPase as revealed by electron microscopy and image-processing
J. Cell. Biol. 98: 1836-1841, 1984
60. Mujais S.K., Chekal M.A., Jones W.J., Hayslett J.P., Katz A.I.
Regulation of renal Na-K-ATPase in the rat. Role of the natural mineralo- and glucocorticoid hormones
J. Clin. Invest. 73: 13-19, 1984

61. Mujais S.K., Chèkal M.A., Jones W.J., Hayslett J.P.,
Katz A.I.
Modulation of renal sodium-potassium-adenosine triphos-
phatase by aldosterone
J. Clin. Invest. 76: 170-176, 1985
62. O'Neil R.G., Dubinsky W.P.
Na-dependent mineralocorticoid regulation of the corti-
cal collecting duct (CCD)
Fed. Proc. 42: 475, 1983
63. O'Neil R.G., Dubinsky W.P.
Micromethodology for measuring ATPase activity in renal
tubules: mineralocorticoid influence
Am. J. Physiol. 242: C314-C320, 1984
64. O'Neil R.G., Hayhurst R.A.
Sodium-dependent modulation of the renal Na-K-ATPase:
influence of mineralocorticoids on the cortical collec-
ting duct
J. Membr. Biol. 85: 169-179, 1985
65. Perkins F.M., Handler J.S.
Transport properties of toad kidney epithelia in cul-
ture
Am. J. Physiol. 241: C154-C159, 1981
66. Petty K.J., Kokko J.P., Marver D.
Secondary effect of aldosterone on Na-K-ATPase activity
in the rabbit cortical collecting tubule
J. Clin. Invest. 68: 1514-1521, 1981
67. Rabito C.A., Ausiello D.A.
Na⁺-dependent sugar transport in a cultured epithelial
cell line from pig kidney
J. Membr. Biol. 54: 31-38, 1980

68. Rayson B.M., Edelman I.S.
Glucocorticoid stimulation of Na-K-ATPase in superfused distal segments of kidney tubules in vitro
Am. J. Physiol. 243: F463-F470, 1982
69. Rhee H.M., Hokin L.E.
Inhibition of the purified sodium-potassium activated adenosine triphosphatase from the rectal gland of *Squalus acanthias* by antibody against the glycoprotein subunit
Biochem. Biophys. Res. Comm. 63: 1139-1145, 1975
70. Rikilis T.R., Quastel J.H.
Effects of cations of sugar absorption by isolated surviving guinea pig intestine
Canad. J. Biochem. 36: 347-362, 1958
71. Robinson J.D., Flashner M.S.
The $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase. Enzymatic and transport properties
Biochem. Biophys. Acta 549: 145-176, 1979
72. Sansom S.C., O'Neil R.G.
Mineralocorticoid regulation of apical cell membrane Na^+ and K^+ transport of the cortical collecting duct
Am. J. Physiol. 248: F858-F868, 1985
73. Scott W.N., Sapirstein V.S.
Identification of aldosterone-induced proteins in the toad urinary bladder
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 4056-4060, 1975
74. Sen. A.K., Post R.L.
Stoichiometry and localisation of adenosine triphosphatase-dependent sodium and potassium transport in erythrocyte
J. Biol. Chem. 239: 345-352, 1964

75. Simons T.J.B.
Vanadate - a new tool for biologists
Nature London 281: 337-338, 1979
76. Stopp M., Horster M.
Protein content of epithelial cells of rabbit renal cortical collecting tubules (CCT) during growth in culture
Cell. Biol. Intern. Rep. 10: 27-31, 1986
77. Sugino Y., Miyoshi Y.
The specific precipitation of orthophosphate and some biochemical applications
J. Biol. Chem. 239: 2360-2464, 1964
78. Vandewalle A., Farman N., Bencsath P., Bonvalet J.P.
Aldosterone binding along the rabbit nephron: an autoradiographic study on isolated tubules
Am. J. Physiol. 240: F172-F179, 1981
79. Walsh D.A., Chen L-J.
A reinvestigation of the kinetic parameters of phosphoenolpyruvate carboxykinase
Biochem. Biophys. Res. Comm. 45: 669-675, 1971
80. Watlington C.O., Perkins F.M., Munson P.J., Handler J.S.
Aldosterone and corticosterone binding and effects on Na^+ transport in cultured kidney cells
Am. J. Physiol. 242: F610-F619, 1982
81. Weer, de P.
Cellular sodium-potassium transport
The Kidney: Physiology and Pathophysiology;
edited by Seldin D.W., Giebisch G., Raven Press,
New York, 1985

82. Wilson P.D., Horster M.F.

Differential response to hormones of defined distal
nephron epithelia in culture

Am. J. Physiol. 244: C166-C174, 1983

83. Zampighi G., Kyte J., Freytag W.

Structural organisation of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in purified
membranes

J. Cell. Biol. 98: 1851-1864, 1984

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Horster für die Überlassung des Themas und für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und der Auswahl der Literatur.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frl. Renate Gleich für ihre Mithilfe bei den analytischen Arbeiten.

Lebenslauf

Michael Fritz Wolfgang Schmolke

1959	20.7. geboren in München Eltern: Wolfgang Schmolke, Technischer Angestellter, und Martina Schmolke, geb. Bude, Hausfrau.
1965 - 1967	Petrarca-Volksschule, München
1967 - 1969	Paulcke-Volksschule, München
1978	Abitur
1978 - 1979	Grundwehrdienst
1979	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
1981	1.4. Beginn der wissenschaftlichen Mitarbeit am Physiologischen Institut der Universität München (Lehrstuhl Prof. Dr. Thureau) in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Horster. Arbeitsgebiet: Hormonelle Regulation der Na-K-ATPase in gezüchteten Sammelrohrepithelien.
1986	30.4. Abschluß des Studiums mit Bestehen der Ärztlichen Prüfung.

Familienstand: ledig

Konfession: römisch-katholisch

